Über Diazotierung und Kupplung der Proteine

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt

von der Philosophischen Fakultät der

Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

Von

Mateï Rohrlich

aus Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 1931.

Tag der Promotion: 1. März 1933

1933

Dissertationsdruckerei u. -Verlag Konrad Triltsch, Würzburg

183

Referenten: Prof. Dr. Schlenk.

Prof. Dr. Bodenstein.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhalt.

Seite

Einleitung. 1

I. Diazotierung und Kupplung von Proteinen und Hydrolyse des Kupplungsproduktes 1

II. Theorie des Reaktionsvorganges der Diazotierung und der dabei auftretenden Gelbfärbung 2

1. Die Diazotierung 2

2. Die Gelbfärbung 5

Theoretischer Teil. 6

I. Diazotierungs- und Kupplungsversuche mit nitriertem Protein, Nitrotyrosin, Phenylalanin und Diketopiperazin . . . 6

II. Isolierung von α-N-Benzoyl-Tyrosin-Diazoniumverbindungen durch Diazotierung des durch Reduktion des Nitro-Benzoyl-Tyrosins gewonnenen Amino-Benzoyl-Tyrosins und Kupplung des erhaltenen Diazoniumproduktes mit β- Naphtol bezw. α-Naphtylamin 7

1. Die Millon'sche Reaktion 7

2. Benzoyltyrosin 8

3. Diazoniumsalze des Benzoyltyrosins 9

a. Nitro-Benzoyl-Tyrosin 9

b. Amino-Benzoyl-Tyrosin 10

c. Diazotierung des Amino-Benzoyl-Tyrosins und Kupplung des Benzoyl-Tyrosin-Diazoniumchlorids 11

III. Versuche zur Isolierung einer α-N-Benzoyl-Diazoniumverbindung durch direkte Diazotierung des Benzoyltyrosins und Darstellung von N-Benzoyl-Tyrosin-Azofarbstoffen aus diazotiertem Benzoyltyrosin 13

Experimenteller Teil. 15

I. Darstellung des l-Tyrosins aus Seide 15

II. Darstellung des Di-Benzoyl-Tyrosins 15

III. Darstellung des Mono-α-N-Benzoyl-Tyrosins 16

1. Tyrosin-Äthylester-Chlorhydrat 16

2. Benzoylierung des Tyrosin-Äthylester-Chlorhydrats . . . 16

3. Verseifung des Benzoyl-Tyrosin-Äthylesters 17

4. Darstellung des Di-Brom-Benzoyl-Tyrosins 17

IV. Versuche zur Einführung der Nitrosogruppe in das Benzoyl-Tyrosinmolekül 17

V. Darstellung des Amino-N-Benzoyl-Tyrosins 19

1. Mono-Nitro-Benzoyl-Tyrosin 19

a) Verseifung des Nitro-Benzoyl-Tyrosins 19

Seite

2. Reduktion des Nitro-Benzoyl-Tyrosins 20
a) Benzoyl-Amino-Di-Benzoyl-Tyrosin 21

VI. Diazotierung des Amino-Benzoyl-Tyrosins 22

VII. Kupplung des Benzoyl-Tyrosin-Diazoniumchlorids mit β-Naphtol 23

VIII. Kupplung des Benzoyl-Tyrosin-Diazoniumchlorids mit α-Naphtylamin 23

IX. Diazotierung des Benzoyltyrosins und Kupplung der erhaltenen Diazoniumlösung mit β-Naphtol bezw. α-Naphtylamin 24
1. Kupplung mit β-Naphtol 25
2. Kupplung mit α-Naphtylamin 25

Einleitung.

I. Diazotierung und Kupplung von Proteinen und Hydrolyse des Kupplungsproduktes.

M. P. Richard[1]) behandelte Wolle und Seide mit salpetriger Säure und beobachtete neben einer Stickstoffgasentwicklung eine langsam intensiver werdende Gelbfärbung der Faser, die nach einiger Zeit ein Maximum erreichte. Diese ist den Untersuchungen von Blau[2]) zufolge von der Konzentration der salpetrigen Säure, von der Temperatur und von der zur Freisetzung der salpetrigen Säure aus ihren Salzen verwendeten Säure abhängig. Die Schwelle des Redaktionseintritts liegt bei Zimmertemperatur zwischen 1/5000 und 1/1000 normal, ist also außerordentlich niedrig.

Werden Proteine in gleicher Weise mit Salpetersäure behandelt, so beobachtet man eine von der vorigen äußerlich in nichts unterschiedliche Reaktion, während die Gasentwicklung ausbleibt. Die Schwelle des Eintritts dieser als „Xanthoproteinreaktion" allgemein bekannten Eiweißreaktion liegt jedoch wesentlich höher, nämlich bei 2,5 normal, also etwa 1000 mal so hoch, wie der durch die salpetrige Säure erfolgende Reaktionseintritt. Beide Färbungen sind licht- und luftempfindlich und schlagen bei Behandlung mit Alkali, Soda oder Ammoniak in braun bzw. orange um.

Wird nun das im Dunkeln hergestellte mit saurer Harnstofflösung zur Zerstörung anhaftender Reste von salpetriger Säure gewaschene „Diazoprotein" einerseits und ebenfalls im Dunkeln hergestelltes „Nitroprotein" andererseits in eine gesättigte Lösung von α-Naphtylaminchlorhydrat mit 3—4% freier Salzsäure gebracht und im siedenden Wasserbad erwärmt, so färbt sich das Diazoprotein bald intensiv violett, während das Nitroprotein unverändert bleibt, wenn man von einer schmutzigen, durch die heiße Säure verursachten Verfärbung absieht. Beim Auswaschen mit Wasser wird die Färbung des mit salpetriger Säure vorbehandelten Proteins rötlicher, Säurezusatz regeneriert das intensive Violett. Allem Anschein nach ist ein Azofarbstoff entstanden.

Eine ähnliche „Kupplung" erfolgt bei Einwirkung einer schwach alkalischen Lösung von β-Naphtol auf das Diazoprotein. Die Kupplungsfarbe ist in diesem Falle rot, und kann ebenfalls nur beim Diazo — nicht beim Nitroprotein erhalten werden. Neben diesen beiden Kupplungskomponenten kommen noch einige andere in Betracht, doch sind diese die wichtigsten, da sie die intensivsten und einwandfreisten Färbungen erzeugen.

Die Kupplung bleibt aus, wenn das Diazoprotein vorher einige Zeit über 50° erwärmt wird. Daß trotzdem in der viel wärmeren Naphtylaminlösung Farbstoffbildung eintritt, scheint darauf zu beruhen, daß die Kupplungsgeschwindigkeit des Diazoproteins viel größer ist als dessen Zersetzungsgeschwindigkeit. Übrigens sind auch Diazoverbindungen bekannt, die bei höherer Temperatur kuppeln.

Die violette Farbe läßt sich nach Wittacker[3]) wesentlich vertiefen, wenn man das gekuppelte Protein noch einmal diazotiert und mit alkalischer

---

[1]) M. P. Richard, Monit. scientif. 1888 S. 1379.

[2]) O. Blau: „Über die Einwirkung der Salpetersäure und salpetrigen Säure auf Eiweißstoffe unter besonderer Berücksichtigung der bei diesen Reaktionen auftretenden Farbstoffbildung." Dissertation T.H. Berlin 1923.

[3]) Wittacker, The Dyer and Calico Printer, 1920 S. 120.

Naphtollösung behandelt. Dieser Befund entspricht der Erfahrung, daß die aus Azofarbstoffen durch wiederholte Diazotierung und Kupplung hergestellten Bisazofarbstoffe ganz wesentlich tiefer bis zum schwarz gefärbt sind.

Blau[4]) fand, daß violett gekuppelte Wolle oder Seide sich in konzentrierter, warmer Salzsäure zu einer klaren violetten Flüssigkeit hydrolysieren läßt. Versetzt man diese Lösung mit Alkali, so schlägt die Farbe nach Überschreiten des Neutralpunktes reversibel in rot um. Der Farbstoff besitzt also Indikatoreigenschaften. Durch Ausschütteln mit den verschiedensten organischen Lösungsmitteln ist er aus der wässrigen Lösung nicht extrahierbar. Dem Hydrolysat der zweifach gekuppelten Proteine fehlt dagegen die Indikatoreigenschaft. Es ist in saurer wie in alkalischer Lösung rot. An dem Ergebnis ändert sich auch nichts, wenn man die Hydrolyse mit Alkali vornimmt und dann ansäuert.

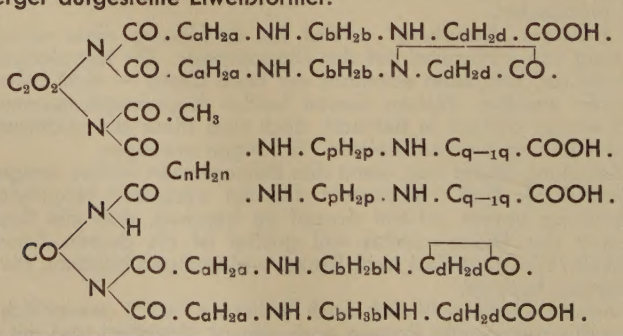
II. Theorie des Reaktionsvorganges der Diazotierung und der dabei auftretenden Gelbfärbung.

Aus dem bisher Mitgeteilten geht somit hervor, daß sich offenbar Proteine wie primäre aromatische Amine in dem Sinne verhalten, daß sie sich durch salpetrige Säure diazotieren und nachträglich wie Diazoniumsalze verkuppeln lassen. Was nun die dabei auch auftretende Gelbfärbung betrifft, so wurde bereits die Beobachtung von Gerngroß und Blau[5]) mitgeteilt, daß die „Diazoproteine" bei der Erwärmung ihre Kupplungsfähigkeit verlieren unter Beibehaltung der Gelbfärbung. Das gleiche gilt für in der Wärme hergestelltes Diazoprotein, das noch stärker gelb ist, als das kalt bereitete, das aber — wie gesagt — nicht kuppelt. Es liegen also bei der Einwirkung der salpetrigen Säure mindestens 2 Reaktionen vor: Eine, die die Gelbfärbung verursacht, und eine zweite, die die Kupplung mit Phenolen und primären aromatischen Aminen verursacht und als „Diazotierung" angesprochen wird.

1. Die Diazotierung.

Über den Charakter dieser letzteren als Diazotierung angesprochenen Reaktion gehen die Meinungen stark auseinander.

Einige Forscher, so Richard[6]), E. Bentz und F. I. Jarrel[7]) treten für eine Diazotierung ein und nehmen die Diazotierung von im Eiweißmolekül präformierten aromatischen Aminogruppen an. Proud'homme[8]) und Flick[9]), die diese Ansicht bestreiten, stützen sich auf die alte, von Schützenberger aufgestellte Eiweißformel:



[4]) O. Blau, Dissertation T.H. Berlin 1923.
[5]) Vgl. Houben-Weyl, Meth. d. org. Chemie IV S. 693 (1924).
[6]) M. P. Richard, Monit. scientif. 1888 S. 1379.
[7]) E. Bentz und F. I. Jarrel, Journ. soc. chem. Ind. 1897 S. 405.
[8]) Proud'homme, Monit. scientif. 1898 S. 467.
[9]) V. Flick, Bull. soc. Ind. Mulhouse, 69 S. 221 (1899).

Da diese Formel keine Aminogruppen, sondern nur Iminogruppen enthält, eine direkte Diazotierung also nicht erfolgen kann, führen sie die Erscheinung auf die durch Einwirkung der salpetrigen Säure auf die Wolle erfolgende Bildung eines Nitrosamins zurück, das mit Phenolen ebenfalls Färbungen ergeben würde. E. Grandmougin und H. Bourry[10]) bestätigen die Flick'schen Versuche mit sauren und basischen Farbstoffen und nehmen ebenfalls eine Nitrosierung an, führen jedoch gleichzeitig als Einwand gegen die Nitrosierung das Ausbleiben der Liebermann'schen Nitrosoreaktion an. Eine ausführliche Würdigung weiterer Theorien wurde von Blau[11]) vorgenommen.

Die Bildung von Nitrosoverbindungen besitzt wenig Wahrscheinlichkeit, da — wie oben erörtert — die Liebermann'sche Reaktion ausbleibt und da derartige Verbindungen temperaturlabiler sein müßten, als es die Diazoproteine sind. Die Bildung eines Nitrosamins vermag außerdem nicht den Farbenumschlag mit Alkali zu erklären.

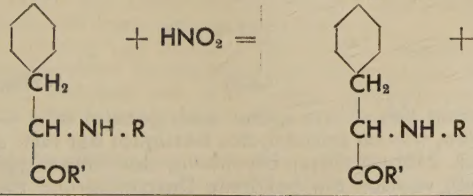
Zahlreich sind dagegen die Gründe, die für eine Diazotierung sprechen. Zunächst sei eine Theorie zur Erklärung des Zustandekommens einer Diazotierung entwickelt. Sie stammt von Gerngroß und Blau[12]) und findet eine wesentliche Stütze in einer Arbeit von Morel und Sisley[13]), auf die in vorliegender Untersuchung noch hingewiesen werden wird.

Die salpetrige Säure wirkt hiernach auf die im Eiweißmolekül fraglos vorhandenen Phenol-Derivate ein unter Bildung eines Nitrosophenols. Als Phenolderivat kommt aber nur das Tyrosin in Frage. Tyrosin läßt sich mit salpetriger Säure „diazotieren" und dann mit β-Naphtol zu einem roten Farbstoff von derselben Farbe, wie sie gekuppeltes Protein aufweist, kuppeln.

Die Einwirkung der salpetrigen Säure auf das Eiweiß könnte so erklärt werden, daß das zur leicht abspaltbaren Hemigruppe gehörige Tyrosin durch die Einwirkung der salpetrigen Säure aus dem Molekülverband herausgelöst wird, dann diazotiert und gekuppelt und schließlich als Alanin- oder Milchsäurederivat auf der im übrigen bezüglich der Struktur erhaltenen Faser echt gefärbt wird.

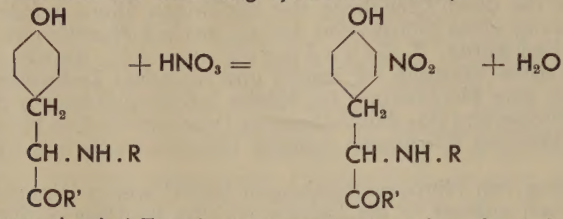
Viel wahrscheinlicher ist es aber, daß die Molekülstruktur erhalten bleibt, und daß die Diazotierung und Kupplung sich am „Tyrosinpeptid" vollzieht. Ein Versuch von Morel und Sisley, die fanden, daß die Farbe „echt" diazotierter und gekuppelter Seide gegen siedende Seifenlösung beständig war, während mit dem aus diazotiertem Tyrosin und β-Naphtol gewonnenen Produkt angefärbte schnell die Farbe verlor, spricht für die letztere Annahme.

Wir können die primäre Reaktion mit dem Tyrosin folgendermaßen formulieren, wobei R und R' die anderen in polypeptidartiger Verkettung gebundenen Aminosäuren des Proteinmoleküls bedeuten sollen. Die OH-Gruppe des Tyrosins muß frei sein, da — wie noch später dargelegt werden wird — durch Substitution im Phenolhydroxyl, z. B. im Dibenzoyltyrosin, die Diazotierbarkeit und Kupplungsfähigkeit, wie auch die Millon'sche Reaktion verschwinden.



[10]) E. Grandmongin u. H. Bourry, Bull Soc. Ind. Mulhouse 69, S. 227 (1899).
[11]) O. Blau, Dissertation T.H. Berlin, 1923.
[12]) O. Blau: Die von M. P. Richard, Monit. scientif. 1888, S. 1379, entdeckte Erscheinung, daß mit salpetriger Säure behandelte Wolle in Gegenwart von Alkali mit Phenolen „kuppelt", ist nach Möglichkeit aufzuklären und überhaupt die Einwirkung der salpetrigen Säure auf Wolle, durch welche diese gelb gefärbt wird, zu untersuchen. Diplomarbeit T.H. Berlin, 1923.
[13]) Morel und Sisley, Bull. Soc. chim. France 41 S. 1217, 42 S. 881 (1927/28).

Diese Reaktion verläuft demnach analog der Bildung von Nitrotyrosin, welche durch die untenstehende Gleichung symbolisiert wird,



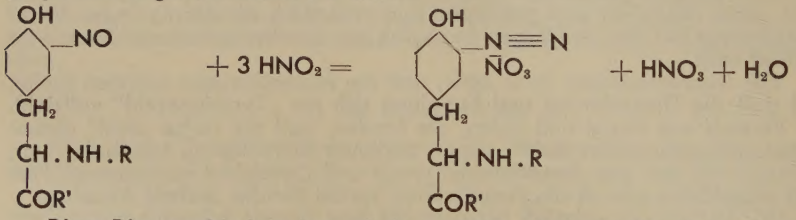
und kann zwanglos bei Tyrosin angenommen werden, da es ja ein Phenolderivat ist, und diese Reaktion bei Phenolen bekannt ist. Das Nitrotyrosin könnte dann durch die nach:

$$3\ HNO_2 \rightarrow HNO_3 + 2\ NO + H_2O$$

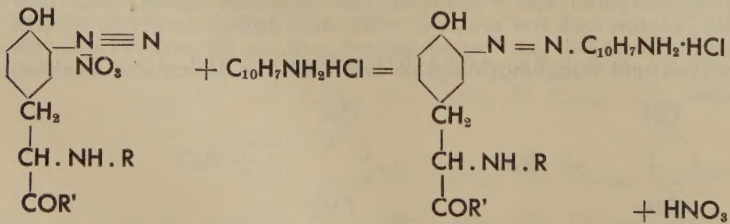
entstehende nascente Salpetersäure zu einem Nitrokörper oxydiert werden,[14]) oder was wahrscheinlicher und vor allem im Zusammenhang mit der bisher ungeklärten Diazotierung ist, durch 3 weitere Mole salpetriger Säure in Diazoniumnitrat verwandelt werden. Die Umwandlung eines Nitrosokörpers zu einer Diazoniumverbindung ist eine bekannte Erscheinung. So läßt sich z. B. Nitrosodiphenylamin mit Natriumnitrit und Schwefelsäure in das p-Anilidobenzoldiazoniumsulfat verwandeln.[15])

$$C_6H_5 . NH . C_6H_4 . NO + H_2SO_4 + 3\ HNO_2 . =$$
$$C_6H_5 . NH . C_6H_4 . N = N . HSO_4 + 2\ HNO_2 + H_2O .$$

Die Diazotierung des intermediär gebildeten Nitrosotyrosinderivates ginge also folgendermaßen vor sich:



Diese Diazoverbindung kuppelt dann mit Naphtylamin, Naphtol etc. ganz normal nach:



Die ganze Reaktion kann sich — wie später noch gezeigt wird — sowohl an freiem Tyrosin abspielen, wie an solchem, das bezüglich der NH_2 und COOH-Gruppen festgelegt ist. Neben dieser Einwirkung der salpetrigen Säure auf tyrosininhaltiges Eiweiß, verläuft die bekannte Desamidierung der freien aliphatischen Aminogruppen.

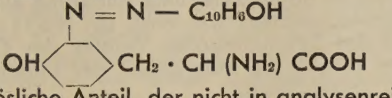
Es ist nun Morel und Sisley[16]) gelungen, durch Diazotierung von Tyrosin und Kupplung des „Diazoproduktes" mit β-Naphtol einen Tyrosinazofarbstoff zu isolieren.

---

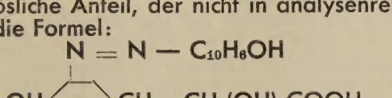
[14]) Bayer und Caro, Ber. 7 S. 693 (1874).
[15]) Vgl. Houben-Weyl, Meth. d. org. Chemie IV, S. 598 (1924).
[16]) Morel und Sisley, Bull. Soc. Chim. France 42 S. 881 (1928).

Zur Darstellung des Tyrosinazo-β-Naphtols wurden 18 g Tyrosin in 65 ccm Salzsäure verteilt und die Suspension auf 2 Ltr. verdünnt. In die auf 10° C abgekühlte und im Dunkeln aufbewahrte Lösung wurde dann innerhalb einer Stunde unter Umrühren eine Lösung von 35 g Natriumnitrit in 500 ccm Wasser eingetragen, und das Gemisch 36 Stunden lang einer Temperatur von 100° C überlassen. Die sich langsam gelb färbende Lösung erreichte nach 36 Stunden ein Maximum in ihrer Färbung. Die Tyrosinlösung wurde schließlich in eine alkalische Lösung von β-Naphtol gegossen, auf 1 Ltr. verdünnt und zur Neutralisation überschüssiger Salzsäure mit einem Überschuß von Ammoniak versetzt. Nach 48 Stunden Kupplung und nach Ansäuren mit Essigsäure resultierte ein lebhaft rotes, aus Alkohol umkristallisierbares Produkt, das sich als ein Gemisch zweier Farbstoffe erwies. Durch Alkohol wurde das Farbstoffgemisch in einen löslichen und einen schwer löslichen Farbstoff zerlegt.

Die Farbe und Färbung auf Seide war völlig identisch mit der aus Proteinen nativ erzeugten Naphtolkupplungsfarbe. Der schwer lösliche Anteil ergab Analysendaten, die leidlich auf die Formel:



stimmten. Der leicht lösliche Anteil, der nicht in analysenreinem Zustande erhalten wurde, dürfte die Formel:



besitzen, wäre also ein Milchsäurederivat, das durch die Einwirkung überschüssiger HNO_2 auf die freie aliphatische Aminogruppe des Tyrosins entstanden ist.

2. Die Gelbfärbung.

Eine plausible Erklärung für die bei der Diazotierung auftretende Gelbfärbung zu finden, dürfte nicht schwer sein. Bei der Xanthoproteinreaktion handelt es sich um die Bildung gelb gefärbter Nitroderivate, vornehmlich solcher des Tyrosins, wie Inouje[17]) durch die Isolierung von Nitrotyrosin aus Nitroseide zeigen konnte. Der andere Hauptträger dieser Reaktion ist das Tryptophan, das ebenfalls gelb gefärbtes Nitrotryptophan liefert. Der Anteil dieser beiden Komponenten an der Intensität der Gelbfärbung wurde von Mörner[18]) quantitativ erfaßt: In saurer Lösung färbt Tryptophan dreimal stärker als Tyrosin, in alkalischer Lösung Tyrosin 5 mal stärker als Tryptophan.

Phenylalanin gibt nach den eingehenden Untersuchungen Blaus keine Xanthoproteinreaktion.

Genau die gleichen Produkte können auch bei der Diazoreaktion auftreten, da ja durch den Zerfall der salpetrigen Säure Salpetersäure entsteht, die in statu nascendi besonders stark wirksam ist.

Durch die Bildung von Nitrogruppen wird in beiden Fällen auch das bei den Reaktionsprodukten beobachtete Verhalten gegen Alkali erklärt. Nitrophenol ist gelb, während sein Natriumsalz dunkelrot ist. Durch Säurezusatz kann die gelbe Farbe regeneriert werden, ebenso beim Nitro- und Diazoprotein.

In Folgendem werden wir noch sehen (S. 29), daß das von mir erstmalig dargestellte Diazoniumnitrat ein stark gelb gefärbter Stoff ist. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß im Gegensatz zu der Ansicht von Blau die Gelbfärbung einerseits durch die primäre Diazotierung und evtl. andererseits durch die Nitrierung veranlaßt ist.

Jedenfalls ist ersichtlich, daß die Gelbfärbung ein sekundär auftretender Vorgang ist, während die Kupplungsfähigkeit durch die primäre Reaktion zwischen dem Phenolrest des Tyrosins mit salpetriger Säure wohl erklärlich ist.

---

[17]) Inouje, Z. physiol. Ch. 81 S. 80 (1912).
[18]) C. Th. Mörner, Z. physiol. Ch. 107 S. 203 (1919).

Theoretischer Teil.

Obwohl somit bereits ein gewichtiges Versuchsmaterial vorliegt, das für die wirkliche Diazotierung und Kupplung der Proteine zu Azo-Farbstoffen spricht, wird die Einwirkung der salpetrigen Säure auf die Eiweißstoffe und die geschilderte Farbstoffbildung noch immer als problematisch bezeichnet. Eine deutliche Illustration dafür bietet eine Äußerung eines so hervorragenden Farbstoff- und Textilfachmannes wie Prof. Dr. Haller[1]), der erst kürzlich auf dem Kongreß des Internationalen Vereins der Chemiker-Coloristen in Mailand in seinem Referat die Möglichkeit der Diazotierung der Wolle als „Wollegende" bezeichnete.

Es erschien also im Anschluß an die Arbeiten von Gerngroß und Blau[2]) und Morel und Sisley[3]) durchaus lohnend, den Gegenstand einer erneuten experimentellen Prüfung zu unterziehen. Die Hypothese sollte erhärtet werden, derzufolge das Tyrosin die Ursache oder hauptsächlichste Ursache der Diazotierung und Kupplung der Proteine sei. Es war als Ziel dieser Arbeit vor allem anzustreben, zu eindeutigen definierten Diazotierungs- und Kupplungsprodukten des Tyrosins zu gelangen, die bezüglich ihrer Gewinnung und ihrer Eigenschaften in möglichst naher Beziehung zu den Diazotierungs- und Kupplungsprodukten tyrosinreicher Proteine standen.

Es seien zunächst einige negative Feststellungen zur Erhärtung der Theorie mitgeteilt.

I. Diazotierungs- und Kupplungsversuche mit nitriertem Protein, Nytrotyrosin, Phenylalanin und Diketopiperazin.

Geht die Diazotierung und Kupplung des Tyrosins und damit des Proteins in der oben (vgl. S. 9/10) angegebenen Weise vor sich, so dürften Präparate, bei denen die für die Nitroso- bzw. Diazoniumgruppe reservierte o-Stellung zur OH-Gruppe bereits besetzt ist (die p-Stellung des Benzolringes ist durch den Alaninrest beansprucht), z. B. durch die Nitrogruppe, keine Diazotierung und Kupplung mehr zeigen. Wie erwartet, ließ sich weder Nitrotyrosin, noch Nitroseide diazotieren und kuppeln.

Der negative Ausfall dieser Versuche beweist zum mindesten, daß bei der nach der Blau'schen Theorie auftretenden Nitrierung des Tyrosins, die nitrierten Anteile des Proteins nicht mehr für die Diazotierung und Kupplung in Betracht kommen.

Reines Phenylalanin, das der Einwirkung von salpetriger Säure unterworfen und gekuppelt wurde, zeigte nicht die geringste Veränderung. Diese Verbindung kommt also als Ursache für die Diazoreaktion nicht in Betracht. Nur das phenolartige Tyrosin erleidet durch salpetrige Säure die beschriebene Veränderung.

Neuerdings wird bekanntlich die Frage diskutiert, ob nicht diketopiperazinartige Verkettungen in den Skleroproteinen, den Gerüsteiweißstoffen, vorherrschen. Versuche, das einfachste Diketopiperazin, Glycinanhydrid, mit salpetriger Säure in Reaktion zu bringen, verliefen negativ.

---

[1]) Haller, Melliands Textilber. 11 S. 701—703 (1930).
[2]) O. Blau, Dissertation T.H. Berlin, 1923.
[3]) Morel und Sisley, Bull. Soc. Chim. France 42 S. 881 (1928).

II. Isolierung von N-Benzoyl-Tyrosin-Diazoniumverbindungen durch Diazotierung des durch Reduktion des Nitro-Benzoyl-Tyrosins gewonnenen Amino-Benzoyl-Tyrosins und Kupplung des erhaltenen Diazoniumproduktes mit β-Naphtol bzw. α-Naphtylamin.

Die Einwirkung der salpetrigen Säure auf Tyrosin, die ausschließlich von Morel und Sisley[4]) studiert wurde, ist keineswegs eine eindeutige, nach bestimmter Zeit zum Abschluß kommende Reaktion. Das Tyrosin färbt sich bereits nach einem Tage tiefbraun. Dagegen zeigt Wolle, die 14 Tage lang bei Zimmertemperatur in wässriger Lösung von salpetriger Säure belassen wird, unter dreimaliger Erneuerung des Natriumnitrit-Salzsäuregemisches immer die gleiche intensive gelbe Farbe. Das Tyrosin scheint also in der Eiweißbindung gegenüber stärkeren Eingriffen der salpetrigen Säure „geschützt" zu sein.

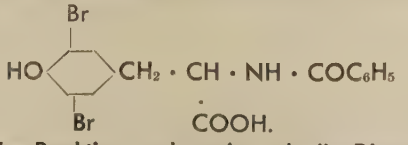
Es lag also der Gedanke nahe, auch reines Tyrosin durch zweckentsprechende Substitution zu schützen, und zwar derart, daß es ähnlich wie im Protein, in welcher die Peptidbildung vorherrscht, substituiert wurde. Eine Substitution an der NH_2-Gruppe schien deshalb besonders vorteilhaft, da durch unübersichtliche Nebenreaktionen der NH_2-Gruppe mit salpetriger Säure unter Bildung von Milchsäurederivaten, wie sie bei den Versuchen von Morel und Sisley auftraten, vermieden werden konnten. Außerdem war zu hoffen, daß ein N-benzoyliertes Produkt hinsichtlich der Thermostabilität und Löslichkeit bessere Eigenschaften als ein nicht-substituiertes Tyrosin besitzen würde. Diese Überlegungen erwiesen sich als durchaus richtig.

1. Die Millon'sche Reaktion.

Das aus Benzoylchlorid und Tyrosin nach Schotten-Baumann leicht herstellbare Dibenzoyltyrosin, das ich zunächst für meine Versuche zu verwenden suchte, ließ sich nicht nitrieren, gab weder eine Millon'sche Reaktion, noch ließ es sich diazotieren und kuppeln. Es mußte also für meine Ziele ausschalten.

Der negative oder positive Ausfall der Diazo- und der Millon'schen Reaktion scheint immer parallel zu gehen. Das Ausbleiben der Diazoreaktion beruht offenbar auf einer durch die Besetzung der OH-Gruppe eingetretenen sterischen Hinderung. Da diese Gruppe nun im Tyrosin des Eiweißverbandes sicher frei ist, so müßte nach obigem, durch Benzoylierung von Protein ebenfalls die Millon'sche Reaktion und die Diazoreaktion verschwinden. Merkwürdigerweise verschwanden aber bei benzoylierter Keratose diese Reaktionen nicht. Die Millon'sche Reaktion ließ sich allerdings nicht ganz eindeutig ausführen, da unter Nitrierung eine starke die Millon'sche Reaktion z. T. überdeckende Gelbfärbung auftrat. Die Kupplung verlief nicht so intensiv, wie bei gewöhnlicher Keratose, aber immerhin deutlich. Ob die Benzoylreste nicht an die OH-Gruppe gegangen sind, oder ob sie durch die salpetrige Säure wieder abgespalten werden, was jedoch unwahrscheinlich ist, war nicht feststellbar.

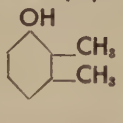
Bei dem später beschriebenen Di-Brom-Derivat des Benzoyltyrosins:

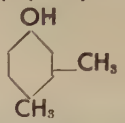


verlief die Millon'sche Reaktion und somit auch die Diazotierung und Kupplung negativ. Ebenso zeigten im Gegensatz zum Benzoyltyrosin, Nitrotyrosin und alle Substitutionsprodukte des Benzoyltyrosins keine Millon'sche Reaktion. Um nun zu ergründen, ob ortho- bzw. meta-Substitution bei Phenolen

[4]) Morel und Sisley, Bull. Soc. Chim. France 41 S. 1217, 42 S. 881 (1928 27).

die Millon'sche Reaktion hindert, untersuchte ich das Verhalten ähnlich substituierter Phenole, wie 1, 2, 3 Xylenol und 1, 3, 4 Xylenol:





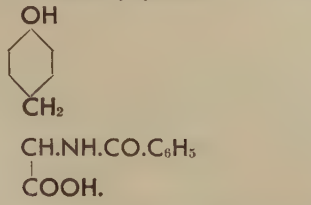
dem Millon'schen Reagens gegenüber. Bei beiden Verbindungen verlief die Millon'sche Reaktion stark positiv. Es erwies sich also als unmöglich, mit Hilfe dieser Vergleichsreaktionen festzustellen, ob bei o- bzw. m-Stellung des Substituenten der Ausfall der Millon'schen Reaktion bedingt ist, oder irgendeinen Schluß bezüglich des Ortes der Substitution zu ziehen.

2. Benzoyltyrosin.

Es wurde nun versucht, ein Derivat des Tyrosins als Ausgangsmaterial für die Diazotierung und Kupplung zu verwenden, das den Phenolrest unverändert besitzt, dessen freie α-Amino-Gruppe jedoch geschützt ist. Zu diesem Zweck wurde der bereits bekannte, leicht zugängliche Mono-N-Chloracetyltyrosinester:

nach E. Fischer[5]) hergestellt. Die Diazotierung dieser Verbindung und Kupplung mit α-Naphtylamin lieferte aber einen Farbstoff, der analysiert von dem berechneten erheblich abweichende Prozentzahlen gab. Es können hierbei unübersehbare Verseifungen stattgefunden haben, andererseits kann auch die salpetrige Säure auf das aliphatische Chlor des Chloracetyls unter Bildung von Nitroderivaten — analog der Bildung von Nitroessigsäure — eingewirkt haben.

Ich versuchte deshalb, die von E. Fischer zur Darstellung des Chloracetyltyrosinesters angegebene Methode auf die Darstellung des Mono-N-Benzoyl-Tyrosinesters anzuwenden, um durch Verseifung des Esters das Mono-N-Benzoyltyrosin zu erhalten und an diesem die Einwirkung der salpetrigen Säure zu beobachten. Am N-Benzoyltyrosin:



konnten bei der Einwirkung der salpetrigen Säure störende Nebenreaktionen kaum auftreten.

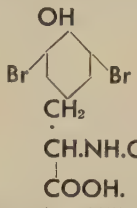
Diese im experimentellen Teil ausführlich beschriebene Darstellungsmethode lieferte das Mono-N-Benzoyl-l-Tyrosin in erheblich besserer Ausbeute auf einfachere Weise als die von Erlenmeyer jun. und Halsey[6]) angegebene und von E. Fischer[7]) verbesserte Methode. Dieses ältere Verfahren beruht auf der Reduktion von Benzamino-Oxyzimtsäure mit Natriumamalgam.

Bei der Verseifung erhält man das Benzoyl-Tyrosin in quantitativer Ausbeute in einer für die Weiterverarbeitung genügenden Reinheit, mit einem Smp. von 163°, nach mehrmaligem Umkristallisieren mit einem konstanten Smp. von 165—166°. Es läßt sich gut aus Alkohol durch Zusatz von Wasser umkristallisieren.

---

[5]) E. Fischer, Ber. 37 S. 2493 (1904).
[6]) Erlenmeyer jun. und Halsey, A. 307 S. 41 (1899).
[7]) E. Fischer, Ber. 32 S. 3639 (1900).

Beim Versetzen der wässrigen oder noch besser einer 30%igen alkoholischen Lösung des Benzoyl-Tyrosins mit Bromwasser fällt ein zuerst plastisches Produkt, das nach kurzer Zeit kristallin erstarrt und sich gut aus 50%igem Alkohol umkristallisieren läßt. Die schönen langen Nadeln schmelzen bei 250°. Es handelt sich der Analyse zufolge um die Di-Bromverbindung des Benzoyltyrosins.



Der neue Körper gab weder eine Millon'sche Reaktion, noch ließ er sich diazotieren und kuppeln. Es zeigt sich also auch hier, daß für den Eintritt der Diazotierung, die Orthostellung zum Phenolhydroxyl unbesetzt sein muß (vgl. auch S. 18).

3. Diazoniumsalze des Benzoyltyrosins.

Den unmittelbarsten klassischen Beweis für die Diazotierbarkeit des Tyrosins in seiner peptidartigen Verkettung, wie sie im Eiweiß vorliegt, würde man erbringen, wenn es gelänge, das Benzoyltyrosin, unmittelbar durch Natriumnitrit und Salzsäure in das Diazoniumsalz zu verwandeln, um dieses zu isolieren. Es war vorauszusehen, daß dies eine schwierige Aufgabe sein würde, da im Tyrosin ein Phenol vorliegt und die Diazotierung zu einem Diazophenol führen müßte, zu einem Körper, der wegen seiner leichten Veränderlichkeit der Isolierung besondere Schwierigkeiten in den Weg stellen mußte.

Es wurde nun zunächst versucht, durch Einwirkung der salpetrigen Säure auf Benzoyltyrosin ein Nitrosoderivat des Benzoyltyrosins zu isolieren, da dieses ja als Zwischenprodukt gemäß der auf Seite 9 angeführten Gleichung zu erwarten war. Die bei der Einwirkung der salpetrigen Säure auf Benzoyltyrosin sich langsam rot färbende alkalische Lösung hinterließ bei der Vakuumdestiallation stets ein rotes pulveriges, amorphes, undefinierbares Zersetzungsprodukt, das in Wasser und Alkohol leicht und in Äther schwer löslich war. Es gelang also nicht, die Nitrosoverbindung des Benzoyltyrosins zu isolieren. Die Nitrosierung wurde nach einer Darstellungsmethode von Julius Schmidt [8]) für α- und β-Nitrosonaphtol vorgenommen. Modifizierung der Versuchsbedingungen bezüglich der Alkalität blieben ebenfalls erfolglos.

Die Schwierigkeiten, die sich offenbar der unmittelbaren Gewinnung einer Nitroso- oder Diazoverbindung des Tyrosins entgegenstellten, waren Veranlassung, einen anderen Weg zu beschreiten, um zu dem Diazoniumsalz des Benzoyltyrosins zu gelangen. Dieses kann ohne Frage als ein Modell für die hypothetische Zwischenstufe bei der Diazotierung des Eiweißes betrachtet werden.

Ich versuchte, durch Nitrierung und durch Reduktion der Nitroverbindung des Benzoyltyrosins zu dem bisher ebenfalls unbekannten Amino-Benzoyltyrosin zu gelangen, in der Hoffnung, auf diese Weise auf einem konstitutionssicheren Wege zu Diazoniumsalzen des Benzoyltyrosins zu kommen. Das Studium der Eigenschaften der auf diese Weise isolierten Diazoverbindungen sollte auch die Möglichkeit erleichtern, unmittelbar aus dem Diazotierungsgemisch des Benzoyltyrosins die Diazoverbindung zu isolieren.

a. Nitro-Benzoyl-Tyrosin.

Es gelang, in fast quantitativer Ausbeute durch Nitrierung des Benzoyltyrosins mit Salpetersäure das Nitrobenzoyltyrosin darzustellen. Das Mono-

[8]) Julius Schmidt, vgl. Houben-Weyl, Meth. d. org. Chemie Bd. IV, S. 84 (1924).

Nitro-N-Benzoyl-Tyrosin, ein in der Literatur bisher noch nicht beschriebener Stoff, kristallisierte in langen gelben Nadeln aus der 25fachen Menge 30%igen Alkohols und schmolz bei 180° unter Zersetzung, war in Wasser und Äther unlöslich. Sehr gut kristallisierte die Verbindung auch aus einer gesättigten Ammoniumacetlösung. In Alkalien löst sie sich mit schöner roter Farbe, die beim Ansäuern reversibel in gelb umschlägt.

Um festzustellen, ob bei der Nitrierung des Benzoyltyrosins die Nitrogruppe an dieselbe Stelle tritt, wie bei der Nitrierung des Tyrosins, versuchte ich, das Nitrobenzoyltyrosin zu verseifen. Als die Verbindung mit der äquivalenten Menge n/1 Natronlauge bei 40° im Brutschrank 18 Stunden lang stehengelassen wurde, trat keine Verseifung ein. Dagegen wurde beim Kochen mit methylalkoholischer Natronlauge die Benzoylgruppe abgespalten und das rote, bisher nicht beschriebene Natriumsalz des Nitrotyrosins erhalten, das sich durch Analyse als rein erwies.

Ich verseifte nun das Nitrobenzoyltyrosin nach der von E. Fischer[9]) für die Verseifung von Benzoyltyrosin zu Tyrosinchlorhydrat angegebenen Methode und zwar mit der 60fachen Menge 20%iger Salzsäure. Nach Abscheidung der abgespaltenen Benzoesäure konnte das bei 236° schmelzende Nitrotyrosin-Chlorhydrat isoliert werden, da sich mit der in der Literatur beschriebenen Nitroverbindung als identisch erwies. [10])

In Ammoniak gelöst und tropfenweise mit Essigsäure versetzt, wurde aus dem Nitrotyrosinchlorhydrat das freie, bei 223° unter Zersetzung schmelzende Nitrotyrosin gefällt. Städeler[11]) gibt an, daß das Nitrotyrosin sich bei Erhitzung über 100° unter schwacher Verpuffung und unter Entwicklung ammoniakalischer Dämpfe zersetze. Diese Beobachtung konnte ich nicht machen. Der von mir ermittelte Zersetzungspunkt stimmt ungefähr mit dem im biochemischen Handlexikon von Abderhalden — danach zersetzt sich das Mono-Nitrotyrosin bei 200° — verzeichneten überein. Das von Inouje[12]) durch Hydrolyse nitrierter Seide gewonnene Nitrotyrosin schmolz bei 216°. Es ist wohl anzunehmen, daß dieses Produkt nicht vollkommen rein war. Sind noch Spuren von Salpetersäure in dem durch Nitrierung des Tyrosins hergestellten Produkt vorhanden, so zersetzt sich dies bereits gegen 100°, eine Beobachtung, die wohl den Irrtum Städelers erklärt.

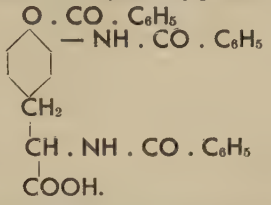
b. Amino-Benzoyl-Tyrosin.

Die Reduktion des Mono-Nitro-Benzoyltyrosins wurde in salzsaurer Lösung mit Zinn vorgenommen, das Zinn aus der stark verdünnten Lösung mit Schwefelwasserstoff gefällt und die filtrierte Lösung im Vakuum vorsichtig eingedampft, bis der größte Teil der Salzsäure verdampft war. Da es nicht möglich war, das Chlorhydrat kristallin zu erhalten, wurde aus einer wässrigen Lösung die freie Base durch tropfenweises Versetzen mit n/1 Natronlauge und zwar in 75—80%iger Ausbeute gefällt. Der zuerst flockige, dunkelgefärbte Niederschlag wurde nach einiger Zeit, beim Impfen mit reinem Material sofort kristallin. Die nadelförmigen Kristalle waren stark verunreinigt, ließen sich aber aus der 30fachen Menge 10%igen Alkohols nach mehrmaligem Aufkochen mit Tierkohle aus der filtrierten Lösung nach Impfung schön farblos gewinnen. Sie schmelzen bei 190° unter Zersetzung. Die Aminoverbindung ist im Wasser schwer, in Alkohol leicht löslich, in Äther und Aceton unlöslich. Sie ist in Lösung jedoch nicht sehr beständig. In Alkalien löst sie sich mit schwach roter, in Säuren mit dunkelgrüner Farbe. Aus der alkalischen Lösung fällt das Amin bei der Neutralisierung flockig aus.

Um ein Derivat der bisher unbekannten Aminoverbindung zu isolieren, versuchte ich, das Benzoyl-Amino-Di-Benzoyl-Tyrosin darzustellen. Bei der Benzoylierung des Amino-Benzoyltyrosins, die nach Schotten-Baumann in alkalischer Lösung mit einem geringen Überschuß von Benzoylchlorid erfolgte, resultierte ein zuerst öliger, bald aber kristallin erstarrender Körper. Die Ana-

[9]) E. Fischer, Ber. 32 S. 3640 (1900).
[10]) Vgl. Abderhalden, Biochemisches Handlexikon, Bd. 13 S. 6 (1931).
[11]) Städeler, A. 116 S. 77 (1860).
[12]) Inouje, Z. f. physiol. Chemie, 81, S. 80 (1912).

lyse identifizierte diese aus absolutem Alkohol umkristallisierbare, bei 225° schmelzende Verbindung als: α-Benzoyl-Amino-β-1-Benzoyl-Oxy-2 Benzoyl-Amino-Phenylpropionsäure d. i., Benzoesäure — [β-(Benzoyl-Oxy -2-N-Benzoyl-Amino-4-Phenyl) — α-Carboxyl-Aethyl]-Amid:



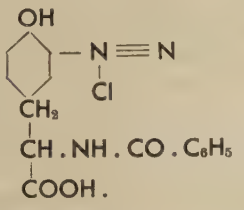
Diese Verbindung zeigte keine Millon'sche Reaktion mehr, was zu erwarten war. Ebenso war eine Diazotierung infolge der Besetzung der Aminogruppe nicht mehr möglich.

c. Diazotierung des Amino-Benzoyltyrosins und Kupplung des Benzoyltyrosin-Diazonium-Clorids.

Nach vielen vergeblichen Versuchen gelang es auch, das Amino-Benzoyltyrosin zu diazotieren. Die Diazotierung, die in stark salzsaurer Lösung vorgenommen wurde, lieferte das Diazoniumchlorid in 90%iger Ausbeute. Als ich zur Diazotierung das Amin vorher in Wasser suspendierte, also in geringerer Säurekonzentration arbeitete, erhielt ich eine gelbe getrübte Lösung, aus der sich nach 24 Stunden noch keine Kristalle abschieden.

Das gelb gefärbte Diazoniumchlorid ließ sich aus der 10fachen Menge Alkohol umkristallisieren, wobei sich die Mutterlauge dunkel färbte. Es ist schwer löslich in Alkohol, Aceton, Chloroform, Äther und Wasser und leicht löslich in Methylalkohol und Eiessig. In Alkalien löst es sich mit dunkelbrauner Farbe.

Die Analyse der umkristallisierten Verbindung lieferte Werte, die auf die Formel:



stimmen.

Da auch die feste Verbindung sehr lichtempfindlich ist, empfiehlt sich die Aufbewahrung im Dunkeln. Besonders lichtempfindlich ist die alkoholische Lösung. Ein mit einer alkoholischen Lösung des Diazoniumchlorids durchtränktes Filtrierpapier färbte sich dem Licht ausgesetzt schwach braun, ließ sich noch 7 Stunden kuppeln, jedoch nicht mehr nach 24 Stunden, und färbte sich mit Natronlauge versetzt dunkelrot.

Das auf gleiche Weise, wie das Diazoniumchlorid dargestellte Diazoniumnitrat besitzt ähnliche Eigenschaften wie jenes. Es sollte isoliert werden, um nach dem Studium seiner Löslichkeit die direkte Diazotierung des Benzoyltyrosins, die zu einem Diazoniumnitrat führen muß, zu erleichtern.

Die Lichtempfindlichkeit dieser Verbindungen gab noch zu folgendem Versuch Anlaß. Ein mit der Diazoniumlösung getränktes Filtrierpapier, das teilweise mit schwarzem Papier bedeckt war, wurde unter die Quecksilberlampe gelegt und ca. 2 Stunden den ultravioletten Strahlen ausgesetzt. Nach dieser Zeit wurde das Papier durch eine Kupplungslösung von salzsaurem α-Naphtylamin gezogen. Hierbei färbten sich die bedeckten Stellen blau, während die bestrahlten nicht mehr kuppelten. Diese Lichtempfindlichkeit

wurde auch bei diazotierter Wolle festgestellt. M. J. Tussenbroek[13]) schlug vor, diese Erscheinung zur Entwerfung photographischer Bilder auf Wolle oder Seide auszunutzen.

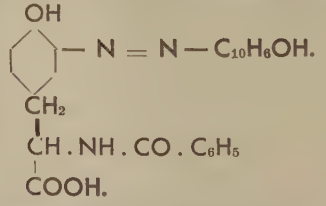
Die Diazophenole besitzen durch ihre Lichtempfindlichkeit ein besonderes Interesse. Es ist bekannt, daß sie durch starke Belichtung „ausbleichen", d. h. ihre Fähigkeit verlieren, mit Azokomponenten zu kuppeln. Dies ist die Grundlage der „Diazotypie", die auch technisch große Bedeutung besitzt. So beruht das bekannte „Ozalith-Verfahren" der I.G.Farbenindustrie A.G. darauf, daß ein Diazophenol, wie z. B. die 1, 2, 4, Diazonaphtolsulfosäure für die Herstellung eines lichtempfindlichen Papieres verwendet wird. Bei der Belichtung unter einem Diapositiv wird an all den Stellen, die durch das Licht getroffen wurden, die Diazoverbindung und damit das Kupplungsvermögen zerstört. Beim Entwickeln mit einer Kupplungskomponente z. B. β-Naphtol, erhält man so in bekannter Weise ein Positiv.

Die intensive Gelbfärbung der Diazoniumsalze brachte mich auf den Gedanken, daß die bei Einwirkung der salpetrigen Säure auf Proteine auftretende Gelbfärbung nicht — wie Blau angenommen hatte — ausschließlich ihre Ursache in der Bildung von Nitrotyrosin besitzt. Ich stellte daher folgenden Versuch an: Nitrierte Wolle, diazotierte Wolle und mit Diazoniumchlorid getränkte Wolle wurde mit Wasser schwach erwärmt. Die mit Diazoniumchlorid getränkte Wolle war am wenigsten haltbar und färbte sich rot, die diazotierte Wolle färbte sich langsam rot und die nitrierte blieb unverändert.

Das Ergebnis dieses Versuches deutet zweifellos darauf hin, daß die Gelbfärbung der Proteine bei Einwirkung von salpetriger Säure ebenfalls durch Bildung eines gelb gefärbten Diazoniumsalzes des Tyrosins erklärt werden kann, wobei analoges Verhalten und Zersetzungsfärbung des Diazoproteins einerseits und des Diazoniumsalzes andererseits auch einen Schluß auf die Diazotierbarkeit des im Eiweißmolekül vorhandenen Tyrosins zulassen. Bei der Zersetzung diazotierter Proteine bildet sich wahrscheinlich ebenso wie bei der Zersetzung des Tyrosindiazoniumsalzes ein Brenzkatechinderivat, und dieses müßte man auch bei der Säurehydrolyse diazotierter Proteine erhalten können.

Gegen die Blau'sche Erklärung der Gelbfärbung durch Bildung von Nitrotyrosin bei Einwirkung der salpetrigen Säure auf Proteine spricht auch noch die von ihm ausgeführte Säurehydrolyse von diazotiertem Protein. Hierbei müßte, falls eine Nitrierung stattfindet, Nitrotyrosin gewonnen werden. Statt dessen erhielt Blau unverminderte Mengen Tyrosin, das er als solches gemäß dem Schmelzpunkt 235° identifizierte. Indessen ist der Zersetzungspunkt von l-Tyrosin, das er eigentlich hätte bekommen müssen, 314—318°. Der Schmelzpunkt der racemischen Verbindung ist 235°. Es ist allerdings nicht einzusehen, warum das Tyrosin entgegen den sonstigen Hydrolysenresultaten racemisiert sein sollte.

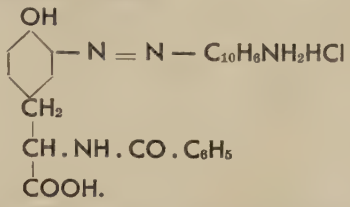
Zur Kupplung des Diazoniumchlorids mit β-Naphtol wurde die wässrige Lösung zu der alkalischen Lösung von β-Naphtol gegossen, wobei die Farbe der Lösung dunkelrot wurde und nach einigen Stunden in ein blaustichiges Rot überging. Der nach 8 Stunden mit verdünnter Essigsäure gefällte hellrote Farbstoff, der sich nicht umkristallisieren ließ, da er sich beim Umlösen in der Wärme zersetzte und beim Fällen aus alkoholischer Lösung mit Wasser eine Gasentwicklung zu beobachten war, wurde zur Analyse mit Alkohol gut gewaschen. Die Analyse stimmte mit dem erwarteten Azofarbstoff:



überein.

[13]) M. J. van Tussenbroek, Chem. Weekbl. 28 S. 62 (1931); Chem. Ztrbl. 1 S. 1833, 1931.

Bei der Kupplung des Diazoniumchlorids mit α-Naphtylamin in saurer Lösung resultierte ein violetter Farbstoff, der in Aceton und Alkohol löslich, schwerer in Äther und unlöslich in Petroläther war. In Alkalien löste er sich mit roter Farbe, die bei Säurezusatz wieder nach violett umschlug. Die Analyse des aus der alkoholischen Lösung mit Wasser gefällten Farbstoffe lieferte im Vergleich mit den für die Formel:



berechneten Werten zu hohe Kohlenstoff- und zu geringe Chlorwerte, während Stickstoff- und Wasserstoffwerte mit den berechneten übereinstimmten. Es war bei der Umkristallisation offenbar Hydrolyse des salzsauren Salzes eingetreten.

III. Versuche zur Isolierung einer N-Benzoyl-Diazoniumverbindung durch direkte Diazotierung des N-Benzoyltyrosins und Darstellung von N-Benzoyltyrosin-Azofarbstoffen aus diazotiertem Benzoyltyrosin.

Nachdem es mir auf eben beschriebene Weise geglückt war, N-Benzoyl-Tyrosin-Diazoniumchlorid und N-Benzoyl-Tyrosin-Diazoniumnitrat zu isolieren und durch Kupplung mit β-Naphtol und α-Naphtylamin zu einem β-Naphtol bzw. α-Naphylaminfarbstoff zu gelangen, kam es mir nun darauf an, durch direkte Diazotierung des N-Benzoyltyrosins die gleichen Produkte zu gewinnen.

Die Diazotierung des reinen Benzoyltyrosins lieferte jedoch leider nicht — wie wir gehofft hatten — die freie Diazoniumverbindung.

Bei der Diazotierung wurde das Benzoyltyrosin in einer großen Menge Wasser suspendiert, da infolge der geringen Wasserlöslichkeit des Benzoyltyrosins große Wassermengen notwendig waren. Auch unter Anwendung geringerer Mengen Wasser gelang es nicht, die Diazoniumverbindung zur Abscheidung zu bringen, da stets nur geringe Mengen Benzoyltyrosin sich lösten und so nie eine gesättigte Lösung zustandekam.

Beim Eindampfen der klaren, gelbgefärbten Diazoniumlösung im Vakuum im Kohlensäurestrom resultierte ein rotes, plastisches, mit der Zeit festwerdendes Zersetzungsprodukt.

Versuche, die wässrige Lösung mit dem über die Aminoverbindung hergestellten reinen Diazoniumnitrat zu impfen, waren auch erfolglos. Da aber die Isolierung eines Azofarbstoffes die Diazotierung des Benzoyltyrosins bei Einwirkung der salpetrigen Säure auf die wässrige Suspension dieser Verbindung ebenfalls bewies, wurde die vom Bodenkörper filtrierte Diazoniumlösung mit einer alkalischen Lösung von β-Naphtol gekuppelt. Die Kupplung geht bedeutend langsamer vor sich, als die des Diazoniumchlorids, auch war die Kupplungslösung nicht so intensiv gefärbt, wie die durch Kupplung des Diazoniumchlorids erhaltene.

Nach 20stündiger Kupplung wurde die tiefdunkelrote Lösung mit verdünnter Essigsäure angesäuert, wobei sich ein hellroter, aus winzigen kristallinen Nadeln bestehender Farbstoff abschied. Der rote Farbstoff war leicht löslich in Aceton und Eisessig, schwer in Ligroin, Äther, Alkohol und Wasser. Da beim Umkristallisieren aus heißen Lösungen stets eine Zersetzung eintrat, wurde der Farbstoff zur Reinigung von überschüssigem β-Naphtol mit Alkohol verrieben und gut gewaschen und so ein analysenreines Produkt erhalten. Er besaß genau die gleichen Eigenschaften wie der durch Kupplung des

Diazoniumchlorids mit β-Naphtol gewonnene. Seine Analyse entsprach dem zu erwartenden Azokörper.

Zur Isolierung des charakteristischer gefärbten Kupplungsproduktes aus diazotiertem Benzoyl-Tyrosin und α-Naphtylaminchlorhydrat wurde die Diazoniumlösung nach Zerstörung der überschüssigen salpetrigen Säure mit Harnstoff in eine alkoholische salzsaure Lösung von α-Naphtylamin eingetragen, wobei sich die Lösung langsam violett färbte. Nach einigen Stunden schied sich ein violetter, zu filzigen Aggregaten vereinigter, aus kristallinen Nadeln bestehender Farbstoff ab. Auch dieser Farbstoff hatte dieselben Eigenschaften und ungefähr dieselbe Zusammensetzung wie oben beschriebener α-Naphtylaminfarbstoff. Der Farbstoff war wie jener löslich in Alkohol und zersetzte sich beim Erhitzen mit einem Lösungsmittel. In Alkalien löste er sich mit roter Farbe, die beim Ansäuern wieder nach blau umschlug. Ihn aus alkoholischer Lösung durch Fällen mit Wasser umzukristallisieren, erwies sich als unvorteilhaft. Die Analyse des so umkristallisierten Produktes ergab wohl stets richtige Stickstoff- und Wasserstoffwerte, jedoch zu hohe Kohlenstoffwerte.

Es war mir also in einwandfreier Weise gelungen, Diazonium- und Azoverbindungen des Mono-N-Benzoyl-Tyrosins zu isolieren. Ferner konnte ich nachweisen, daß die Kupplung der isolierten Diazoniumverbindung mit Azokomponenten die gleichen Azofarbstoffe liefert, wie die Kupplung direkt mit salpetriger Säure behandelten Benzoyltyrosins.

Es ist demnach nicht daran zu zweifeln, daß bei der Einwirkung der salpetrigen Säure auf Wolle und Seide und überhaupt auf Proteine dasselbe vor sich geht, wie bei meinem Modellversuch mit Benzoyltyrosin, daß also wirklich Diazotierung stattfindet, und daß es wohl berechtigt ist, von einer Diazotierung und Kupplung der Wolle zu sprechen, daß es sich also nicht um eine „Wollegende" handelt.

Experimenteller Teil.

I. Darstellung des l-Tyrosins aus Seide.

Die Darstellung des Tyrosins aus Seide wurde nach der von E. Abderhalden und Y. Ternuchi[1]) angegebenen Methode vernommen.

Ein kg. Seidenabfälle wurden mit 3000 ccm rauchender Salzsäure (1,9) 6 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht, dann die Hauptmenge der Salzsäure durch Eindampfen der braun gefärbten Lösung im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser gelöst, und die filtrierte Lösung auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In einem aliquoten Teil der Gesamtflüssigkeit wurde der Salzsäuregehalt titrimetrisch bestimmt und unter Eiskühlung die auf die gesamte Lösung berechnete Menge Natronlauge unter beständigem Rühren hinzugefügt. Der sich bildende schwarzbraun gefärbte Niederschlag wurde nach einstündigem Stehen in Eiswasser abgesaugt, wieder in heißem Wasser gelöst, und die Lösung nach Zusatz von etwa 10 g Tierkohle entfärbt. Beim Abkühlen kristallisierte aus der nunmehr fast farblosen Flüssigkeit reines Tyrosin aus. Durch Eindampfen der Mutterlauge wurden weitere Mengen Tyrosin gewonnen und durch mehrmaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser gereinigt. Die Ausbeute betrug 45 g.

II. Darstellung des Di-Benzoyltyrosins.

Wie im Theoretischen Teil ausgeführt, kam es für die Durchführung meines Arbeitsplanes zunächst darauf an, die α-Aminogruppe des Tyrosins zu besetzen.

Es wurde zunächst das Di-Benzoyltyrosin dargestellt, und zwar nach der Methode von Schotten-Baumann, da in einem Vorversuch die direkte Benzoylierung mit Benzoylchlorid in Benzol oder Toluol als Verdünnungsmittel bei höherer Temperatur keine günstige Ausbeute lieferte. Auch die von E. Fischer[2]) besonders bei der Benzoylierung von Alanin angegebene Methode mit Bikarbonat statt Natronlauge wies schlechtere Ausbeuten auf, als die gewöhnliche Schotten-Baumann'sche Reaktion. Die besten Ergebnisse lieferte das im Folgenden beschriebene Verfahren.

2,5 g Tyrosin wurden in 14 ccm n/1 NaOH und 36 ccm Wasser in der Wärme gelöst, dann, um die Natriumverbindung möglichst feinpulverig zur Abscheidung zu bringen, in Eis gekühlt. Unter Eiskühlung und dauerndem Schütteln wurden alternierend 3 Mol. = 6,5 ccm Benzoylchlorid, die mit 20 ccm Äther verdünnt wurden, und 5 Mol. = 65 ccm n/1 NaOH hinzugefügt. (4 Mol. zur Neutralisierung der bei der überschüssigen Anwendung von Benzoylchlorid entstehenden Salzsäure und Benzoesäure, ein Mol. Überschuß. Die Lösung war zum Schluß stark alkalisch.)

Nach 1½ Stunden wurde die schwach gelbliche, klare Lösung nach der Originalvorschrift von E. Fischer mit eiskalter Salzsäure stark übersättigt, wobei die Benzoylverbindung neben Benzoesäure ausfiel. Der kristalline Niederschlag wurde nach einigem Stehen filtriert, gewaschen und bei 90° getrocknet. Dann wurde die Benzoesäure mit Äther extrahiert und der Rückstand des öfteren mit Äther gewaschen und schließlich getrocknet. Ausbeute: 3,8 g = 71% der Theorie.

---

[1]) E. Abderhalden und Y. Ternuchi, Z. f. physiol. Chemie 42 S. 540 (1904).
[2]) E. Fischer, Ber. 32 S. 2454 (1899).

Es wurde aus Eisessig umkristallisiert und aus der Mutterlauge eine zweite Fraktion gewonnen. Das Präparat zeigte den scharfen Smp. 210°, der auch von Fischer angegeben ist.

Mit Millon'schem Reagens trat keine Rotfärbung ein, das Präparat war also nicht durch Tyrosin verunreinigt. Es ist bekannt, daß für den Eintritt der Millon'schen Reaktion eine freie phenolische OH-Gruppe vorhanden sein muß.

Leider zeigte es sich aber, daß die reaktionshindernde Wirkung des O-Benzoylrestes auch die Diazotierung und somit die Kupplung verhinderte. Es liegt hier ein Fall von sterischer Hinderung vor. Das Di-Benzoyltyrosin war demnach für meine Arbeit ungeeignet.

III. Darstellung des Mono-α-N-Benzoyltyrosins.

Nachdem hiermit die Di-Benzoylverbindung für meine Zwecke ausschied, setzte ich meine Versuche mit der Mono-Benzoylverbindung fort, bei der eine sterische Hinderung bei der Diazotierung nicht zu erwarten war. Ich versuchte nun in Anlehnung an die von E. Fischer[3]) für die Darstellung des Chloracetylesters angegebene Methode, den Tyrosinäthylester mit 1 Mol. Benzoylchlorid zu benzoylieren.

1. Tyrosin-Äthylester-Chlorhydrat.[4])

5 g Tyrosin wurden in 35 ccm Alkohol suspendiert und bis zur klaren Lösung ein schneller Strom von trocknem Salzsäuregas eingeleitet. Nach Zusatz des doppelten Volumens Alkohol wurde die Lösung 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann wurde der Alkohol im Vakuum abdestilliert, wobei der salzsaure Ester zurückblieb. Die Ausbeute war quantitativ. Smp. 164,5°.

Der salzsaure Tyrosinäthylester ist in der dreifachen Menge Alkohol bereits löslich und läßt sich aus der alkoholischen Lösung mit Äther in seideglänzenden Nadeln ausfällen. Smp. 166°.

Fischer empfiehlt, die Verbindung aus Essigester umzukristallisieren. Da jedoch der Ester in der 30fachen Menge Essigester noch nicht wesentlich löslich ist, scheint dieses Verfahren nicht empfehlenswert.

2. Benzoylierung des Tyrosin-Äthylester-Chlorhydrats.

3 g trockner Tyrosinester wurden in 30 ccm Chloroform in einer Glasstopfenflasche suspendiert und diese in Eis gestellt. Dann wurden 12,3 ccm eiskalte n/1 NaOH hinzugefügt und, um den Ester vor seiner Verseifung in das Chloroform zu bringen, rasch geschüttelt. Unter Schütteln wurde dann die Hälfte einer Lösung von 1,92 g = 1 Mol. Benzoylchlorid in 20 ccm Chloroform hinzugegeben und darauf alternierend der Rest dieser Lösung und die Lösung von 1,41 g Na_2CO_3 in 6 ccm Wasser. Die von der wässrigen Schicht getrennte Chloroformschicht wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und auf dem Wasserbad eingeengt. Mit Petroläther wurde das Rohprodukt ausgefällt, durch mehrmaliges Lösen in wenig Chloroform und Fällung mit Petroläther nach Impfung rein erhalten.

Zunächst versuchte ich, ähnlich wie das E. Fischer bei der Herstellung des Chloracetyltyrosins getan hatte, die Substanz für die Analyse im Vakuum über Schwefelsäure zu trocknen. Dabei ergaben sich jedoch zu hohe C-Werte, die offenbar durch zurückbleibende geringe Mengen Petroläther veranlaßt waren. Erst bei Trocknung der Substanz in der Trockenpistole bei 100° über festem Paraffin wurde die Substanz von anhaftenden Petrolätherresten befreit.

---

[3]) E. Fischer, Ber. 37 S. 2494 (1904).
[4]) E. Fischer, Ber. 34 S. 451 (1901).

Analyse:

0,1478 g Subst.	0,3730 g CO_2	0,0820 g H_2O	
0,1266 g „	4,9 ccm N_2 21°	767 mm	
$C_{18}H_{19}O_4N$	Ber: 68,9% C	6,12% H	4,48% N
	Gef: 68,7% C	6,20% H	4,54% N

Das Präparat war demzufolge als reiner Mono-N-Benzoyl-Tyrosin-Äthylester anzusprechen. Es zeigte Eigenschaften, die mit den aus der Literatur bekannten übereinstimmten. Der Benzoyltyrosinäthylester wurde bereits von Curtius[5]) aus Benzoyltyrosin, das er nach der von E. Fischer angegebenen umständlichen Methode bereitete, Alkohol und Salzsäure dargestellt. Es schmolz bei 123°, war leicht in Chloroform löslich, schwer in Wasser und Äther und sehr schwer in Petroläther. Die Millon'sche Reaktion war stark positiv.

3. Verseifung des Benzoyl-Tyrosin-Äthylesters.

So leicht die bisher noch nicht beschriebene Benzoylierung des Tyrosinäthylesters gelang, so große Schwierigkeiten setzten sich der — wie man hätte erwarten können — einfach durchführbaren Verseifung in den Weg. Endlich hatte ich mit folgender Methode, bei der eine acetonisch-wässrige Natronlauge zur Anwendung kam, einen sehr befriedigenden Erfolg.

10 g des Benzoyl-Tyrosinesters wurden in der 4fachen Menge Aceton = 40 ccm gelöst und mit 32 ccm NaOH tropfenweise versetzt. Die Lösung wurde nun ca. 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen, darauf mit der äquivalenten Menge n/1 HCl versetzt und schließlich im Vakuum eingedampft. Im Laufe der Vakuum-Destillation schied sich ein gelblich gefärbtes, öliges Produkt ab, das nach Beendigung der Destillation kristallin erstarrte. Die Kristalle wurden abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die Ausbeute war fast quantitativ. Smp. 163°.

Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Alkohol-Wasser schmolzen die Kristalle konstant bei 165°. Dieser Smp. stimmte mit dem von E. Fischer[6]) für Benzoyltyrosin ermittelten überein.

Analyse:

4,438 mg Subst.	10,935 mg CO_2	2,125 mg H_2O	
2,985 mg „	0,128 ccm N_2	20,5° 757 mm	
$C_{16}H_{15}O_4N$	Ber: 67,37% C	5,26% H	4,92% N
	Gef: 67,35% C	5,35% H	4,96% N

Das Präparat erwies sich demnach als reines Mono-N-Benzoyl-Tyrosin. Die Verbindung ist in gleicher Menge Äthyl- und Methylalkohol und Pyridin löslich, in der 500fachen Menge Äther unlöslich.

4. Darstellung des Di-Br-Benzoyltyrosins.

1 g Benzoyltyrosin wurde in 10 ccm 30%igen Alkohols gelöst und solange mit Bromwasser versetzt, bis eine schwache Gelbfärbung auftrat. Es schied sich ein farbloser kristalliner Körper ab, der aus 50%igem Alkohol umkristallisiert bei 245° unter Zersetzung schmolz. Abermaliges Umkristallisieren änderte den Smp. nicht mehr. Die Verbindung zeigte keine Millon'sche Reaktio und ließ sich auch nicht diazotieren und kuppeln.

Analyse:

3,132 mg Subst.	1,113 mg Br.
$C_{16}H_{13}O_4Br_2N$	Ber: 35,24% Br.
	Gef: 35,72% Br.

Versuche zur Einführung der Nitrosogruppe in das Benzoyl-Tyrosinmolekül.

Gelänge es direkt, die Nitrosogruppe in den Phenolkern zu bringen und mit diesem die Diazotierung und Kupplung durchzuführen, so wäre ein ein-

[5]) Curtius u. Donselt, Journ. f. prakt. Ch. 95 S. 356 (1917).
[6]) E. Fischer, Ber. 32 S. 3639 (1900).

wandfreier Beweis der angeführten Theorie gelungen. Leider mußte ich auf diesen Weg der Beweisführung verzichten, da die ausgeführten Versuche keinen Erfolg hatten, d. h. es wurde entweder das Ausgangsprodukt oder ein undefiniertes Produkt gewonnen.

Die Nitrosierung wurde im Prinzip nach einer von Julius Schmidt[7]) für die Darstellung von α- und β-Nitrosonaphtol angegebenen Methode vorgenommen.

Versuch 1). 1,4 g Benzoyltyrosin (1/200 Mol.) wurden in 10 ccm n/1 NaOH (1/200 Mol.) gelöst, mit 9 ccm Wasser verdünnt, auf 10 bis 5° abgekühlt und mit 0,7 g $NaOH_2$ gelöst in 1 ccm Wasser versetzt, dann 10 ccm n/1 HCl (1/100 Mol.) hinzugefügt. Nach 24 Stunden war die langsam sich gelb färbende Lösung dunkelrot und neben gelben Flocken hatte sich ein brauner Niederschlag abgesetzt. Die gelben Flocken waren nach weiteren 24 Stunden verschwunden. Der rotbraune Niederschlag ging beim Erwärmen in Lösung. Die Lösung wurde nun im Vakuum eingedampft und ein rotbrauner, in heißem Wasser löslicher, in Alkohol und Äther unlöslicher Rückstand gewonnen. Beim Erkalten der heißen wässrigen Lösung fiel der rote Körper wieder aus. Die vom Niederschlag dekantierte braune Lösung hinterließ beim nochmaligen Eindampfen im Vakuum ein in kaltem Wasser leicht lösliches, öliges Prodrukt. Beim Ansäuren der wässrigen Lösung fielen braune Flocken, die sich beim Erhitzen wieder lösten.

Versuch 2). Derselbe Versuch wurde dann ohne Wasserzusatz, also in konzentrierterer Lösung, vorgenommen. 1,4 g Benzoyltyrosin wurden in 5 ccm n/1 NaOH gelöst, 0,35 g $NaOH_2$ und 5 ccm n/1 HCl hinzugefügt. Die Lösung reagierte sauer, bei weiterem Säurezusatz trat sofort eine Fällung von rotbraunen Flocken auf. Es gelang jedoch nicht, das rotbraune Zersetzungsprodukt zur Kristallisation zu bringen und zu definieren.

Die Versuche zur Nitrosierung wurden nun mit Benzoyltyrosin-Barium fortgesetzt, in der Hoffnung, dabei vielleicht zu einem schwer löslichen und isolierbaren Nitroso-Benzoyltyrosin-Salz zu gelangen.

Versuch 3). 1,4 g Benzoyltyrosin wurden in 50 ccm n/5 $Ba(OH)_2$ = 1/100 Mol. gelöst und 0,35 g $NaOH_2$ = 1/200 Mol. und 5 ccm n/1 HCl = 1/200 Mol. zugesetzt. In Eis gestellt erschien nach ca. ½ Stunde in der Dunkelheit eine Fällung von kristallinen Nadeln. Die schwach gelb gefärbte Lösung war nach 24 Stunden rot gefärbt, die Kristalle unverändert.

Es bestand die Vermutung, daß durch die Bildung von HNO_2 infolge gesteigerter Acidität das Ba-Salz des Benzoyltyrosins gefällt worden war, und das dann eine Zersetzung erlitten hatte. Ich versuchte deshalb, das Ba-Salz des Benzoyltyrosins zu isolieren.

Versuch 4). 1,4 g Benzoyltyrosin wurden in 13,1 ccm $Ba(OH)_2$, 0,38 n, gelöst und ein etappenweiser Zusatz von 12,4 ccm HCl, 0,4 n, vorgesehen. Bereits nach Zusatz von 2 ccm HCl fiel ein kristalliner Niederschlag, der abgesaugt und getrocknet wurde. 0,25 g dieses Niederschlages wurden in heißem Wasser gelöst — beim Erkalten kristallisierte er wieder aus — und mit der für das Ba-Salz berechneten Menge n/10 HCl = 11,7 ccm versetzt. Schon bei Zusatz geringer Mengen begann sich die Lösung zu trüben, wurde nach weiterem Zusatz einiger Tropfen HCl wieder klar und begann schließlich, Kristalle abzuscheiden. Diese wurden abgesaugt, getrocknet und gemäß ihrem Smp., der bei 164° lag, als Benzoyltyrosin identifiziert.

Weitere 2 ccm HCl fällten aus dem Filtrat weitere Mengen, und nach nochmaligem Versetzen mit 2,2 ccm HCl blieb die Mutterlauge klar. Es wurden im ganzen also 6,2 ccm HCl, 0,4 n (½ Mol.) hinzugegeben. Die getrennt getrockneten Fraktionen begannen gegen 96° zu sintern und schmolzen bei 160°. Der zuerst abfiltrierte Niederschlag wurde in der 8fachen Menge Essigester gelöst, der ungelöste Teil abgesaugt. Letzterer schmolz bei 160—165°.

Die Substanz zeigte grüne Ba-Färbung in der Flamme und Millon'sche Reaktion, die Essigesterlösung hinterließ im Vakuum ein Öl, das durch Reiben zum Kristallisieren gebracht werden konnte (A). Smp. 160°.

[7]) Julius Schmidt, vgl. Houben-Weyl, Meth. d. org. Chemie IV, S. 84 (1924).

Der andere Niederschlag wurde in der 12fachen Menge Essigester gelöst. Der im Vakuum eingedampfte Essigester hinterließ ein farbloses, schaumiges, scheinbar kristallines Produkt, das gegen 55° sinterte und vollständig bei 160° schmolz (B). Es zeigte eine grüne Flammenfärbung und hinterließ am Platinblech Asche.

Analyse A:

18,312 mg Subst. — 3,295 mg $BaSO_4$
$(C_{16}H_{15}O_4N)_2Ba$ — Ber: 19,47% Ba
Gef: 10,64% Ba.

Analyse B:

17,993 mg Subst. — 2,845 mg $BaSO_4$
$(C_{16}H_{14}O_4N)_2Ba$ — Ber: 19,47% Ba
Gef: 9,38% Ba.

Da die Analysen keine eindeutige Aufklärung ergaben, die Substanz scheint ein Gemisch von Benzoyl-Tyrosin und Benzoyltyrosinbarium zu sein, das infolge Hydrolyse entstanden ist, verzichtete ich auf eine weitere Verfolgung dieser Erscheinung.

V. Darstellung des Amino-N-Benzoyl-Tyrosins.

Da die Einführung einer NO-Gruppe in das Benzoyltyrosinmolekül nicht gelang, versuchte ich, das Amino-Benzoyltyrosin darzustellen, um durch dessen Diazotierung die Diazoniumverbindung zu gewinnen.

1. Mono-Nitro-Benzoyl-Tyrosin.

Es gelang mir, diese bisher noch nicht beschriebene Verbindung auf folgende Weise darzustellen.

Ein Teil Benzoyltyrosin wurde in 4 Teilen Wasser suspendiert und mit 4 Teilen HNO_3 (1,3) versetzt. Das ursprünglich farblose Kristallpulver verfärbte sich allmählich. Nach 12stündigem Aufbewahren im Eisschrank schien die Reaktion beendet. Es war eine rein gelbe Substanz entstanden, die abgesaugt und zuerst im Vakuum und dann bei 100° getrocknet wurde. Die Ausbeute war fast quantitativ.

Das Mono-Nitro-Benzoyltyrosin war unlöslich in Wasser, leicht löslich dagegen in Alkohol, und ließ sich gut aus der 25fachen Menge siedenden 30%igen Alkohols umkristallisieren. Es schmolz bei 185° unter Zersetzung. Zur Analyse wurde die Substanz zuerst im Vakuum über Schwefelsäure und schließlich bei 100° getrocknet.

Analyse:

4,790 mg Subst. — 10,310 mg CO_2 1,93 mg H_2O
2,994 mg „ — 0,227 ccm N 26° 759 mm
$C_{16}H_{14}O_6N_2$ — Ber: 58,50% C 4,25% H 8,56% N
Gef: 58,70% C 4,41% H 8,64% N.

a) Verseifung des Nitro-Benzoyl-Tyrosins.

0,5 g Nitro-Benzoyltyrosin wurden in n/1 NaOH gelöst und 18 Stunden lang im Brutschrank einer Temperatur von 40° ausgesetzt. Es war keine Verseifung eingetreten.

Beim Kochen des Nitro-Benzoyltyrosins mit methylalkoholischer Natronlauge fiel ein roter kristalliner Niederschlag aus, der mit Alkohol gewaschen, abfiltriert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurde. Die Analyse identifizierte ihn als das Na-Salz des Nitrotyrosins.

Analyse:

2,420 mg Subst. — 3,855 mg CO_2 — 0,82 mg H_2O
$C_9H_9O_5N_2Na$. — Ber: 43,22% C — 3,63% H
Gef: 43,45% C — 3,79% H.

Der Benzoylrest wurde also abgespalten.

Ich verseifte schließlich das Nitro-Benzoyltyrosin nach der von E. Fischer[8]) für die Verseifung von Benzoyltyrosin angegebenen Methode. Ein Teil der zu verseifenden Substanz wurde mit der 60fachen Menge 20%iger HCl (1,124) 4 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Nach erfolgter Verseifung — die ganze Substanz war in Lösung gegangen — schieden sich beim Erkalten farblose Kristalle ab, die nach 12 Stunden abgesaugt wurden, einen Smp. von 122° zeigten, also Benzoesäure waren. Die gelb gefärbte Lösung wurde im Vakuum eingedampft, wobei sich allmählich ein gelber, kristalliner Körper abschied, der abgesaugt und getrocknet bei 235° unter Zersetzung schmolz, und sich demnach als Nitrotyrosin-Chlorhydrat erwies. Dieses war in Wasser leicht, in Alkohol in der 20fachen Menge löslich und in Aceton unlöslich. Sein Zersetzungspunkt stimmte mit dem für Nitrotyrosin-Chlorhydrat im Biochemischen Handlexikon von Abderhalden verzeichneten überein.

Aus Ammoniak ließ sich durch tropfenweises Versetzen mit Essigsäure aus dem Chlorhydrat das freie, bei 223° unter Zersetzung schmelzende Mono-Nitro-Tyrosin fällen.

Es zeigte sich also, daß bei der Nitrierung des Benzoyltyrosins die Nitro-Gruppe an dieselbe Stelle des Phenolringes trat, wie bei der direkten Nitrierung des Tyrosins.

2. Reduktion des Nitro-Benzoyl-Tyrosins.

Es lag nahe, für die Reduktion des Nitro-Benzoyltyrosins die von G. Beyer[9]) bei der Reduktion des Nitrotyrosins zum Aminotyrosin angewendete Methode zu gebrauchen. Dieser Forscher reduzierte Nitrotyrosin mit Zinn und verdünnter HCl, fällte das Zinn aus der noch warmen Lösung mit H_2S, dampfte dann rasch die Lösung bis zur Kristallhaut ein und versetzte, um Bräunung zu verhindern, während des Abdampfens H_2S-Wasser hinzu. Er erhielt das salzsaure Amino-Tyrosin schon fast farblos, und schied aus diesem durch Neutralisation mit NaOH die freie Amino-Verbindung aus.

Ich kam erst zum Ziel, als ich durch zahlreiche Versuche gelernt hatte, so geringe Säurekonzentrationen bei der Reduktion mit Zinn und Salzsäure zu verwenden, daß eine Abspaltung der Benzoyl-Gruppe nicht eintrat, und als ich darauf verzichtete, das Chlorhydrat zu isolieren, sondern darauf ausging, die freie Aminoverbindung zu gewinnen. Sie erwies sich — wie dies zu erwarten war — als ein schwer löslicher Körper mit relativ günstigen Eigenschaften. Von den von mir vorgenommenen Versuchen seien im folgenden nur die beiden angeführt, die zum Ziele führten. Versuch 1) beschreibt die Reduktion in stark saurer Lösung, wobei z. T. Abspaltung des Benzoylrestes erfolgte. Versuch 2) beschreibt die Reduktion in schwach salzsaurer Lösung.

Versuch 1). 5 g der Nitroverbindung wurden mit 25 ccm HCl (1,19) und mit 10 g Zinn versetzt und am Rückflußkühler erhitzt. Der gelbe Nitrokörper verschwand allmählich, die Lösung war nach Beendigung der Reduktion schwach gelblich gefärbt. In die auf das 25fache, mit Wasser verdünnte Lösung wurde 1 Stunde lang H_2S eingeleitet, schließlich der entstandene Zinnsulfid-Niederschlag abfiltriert und die wasserklare Lösung im Vakuum eingedampft. Nachdem die größte Menge abdestilliert war, schied sich ein farbloses, kristallines Produkt ab, das nach 24 Stunden abgenutscht wurde.

Die noch schwach gelb gefärbte Lösung wurde weiter im Vakuum eingedampft. Die farblosen Kristalle schmolzen bei 122°, waren also Benzoesäure. Es hatten sich 0,15 g Benzoesäure, also ca. 10% der theoretisch zu erwartenden Menge (1,8 g) abgeschieden. Die im Vakuum eingedampfte Lösung färbte sich im Laufe der Destillation braun und hinterließ beim Eindampfen eine schmierige Masse. Nach mehrmaligem Eindampfen unter Zusatz von destilliertem Wasser wurde die braungefärbte Lösung tropfenweise mit n/1 NaOH versetzt. Die sich langsam abscheidenden stark braungefärbten Flocken wurden abgesaugt. Beim Ausschütteln mit Äther fiel ein fast farb-

[8]) E. Fischer, Ber. 32 S. 3640 (1899).
[9]) G. Beyer, Z. 1867 S. 437.

loser Körper aus. Die Lösung wurde weiter mit n/1 NaOH versetzt, wobei immer mehr Substanz ausfiel. Das Gemisch wurde in Eis gestellt und 1 Stunde stehengelassen. Die ganze Menge wurde nun mit Äther durchgeschüttelt, wobei die noch ausgeschiedene Benzoesäure extrahiert wurde. Der dunkel gefärbte Niederschlag begann allmählich in schönen Nadeln zu kristallisieren. Die Kristalle schossen hervor, nachdem der dunkle Niederschlag abfiltriert war. Sie wurden abgesaugt und getrocknet. Smp. 180—185°. Ausbeute an diesem noch unreinen Produkt: 2 g, also ca. 42% der Theorie.

Versuch 2). 8 g des Nitrokörpers wurden in 20 ccm Wasser suspendiert und 20 ccm HCl (1,19) und 10 g Zinn unter vorsichtigem Erwärmen mit freier Flamme reduziert. Die Substanz ging langsam in Lösung, die nach Beendigung der Reduktion schwach gelb gefärbt war. In die auf das 25fache, mit Wasser verdünnte, kalte Lösung wurde zur Ausfällung des Zinns eine halbe Stunde lang H_2S eingeleitet. Die vom Zinnsulfid filtrierte Lösung wurde im Vakuum zur Beseitigung überschüssiger Salzsäure unter häufigerem Zusatz von Wasser eingedampft. Beim Eindampfen schieden sich aus der stark sauren Lösung geringe Mengen gequollener, gallertartiger, durchsichtiger und farbloser Massen ab, die bei näherer Betrachtung aus kristallinen Nadeln zu bestehen schienen. Bei Zusatz von Wasser lösten sie sich wieder mit bräunlich-grüner Farbe. Die fast bis zur Trockne eingedampfte, gallertartige Masse wurde mit etwas Wasser über Nacht stehengelassen und war nach 15 Stunden unverändert. Eine Probe des mit wenig Wasser gelösten Produktes wurde nun tropfenweise mit n/1 NaOH versetzt, wobei sich ein dunkles flockiges Produkt abschied. Es wurde abfiltriert. Aus der noch sauren Lösung fällten weitere Tropfen n/1 NaOH weitere Mengen dunkel gefärbter Flocken. Nach einiger Zeit im Eis begannen die Flocken, sich langsam in schöne kristalline Nadeln zu zerstreuen, schneller noch, wenn man mit einigen, aus obigem Versuch erhaltenen Kristallen impfte. Nach 8 Stunden hatte sich in der Eiskälte ein weißlich-graues kristallines Produkt abgesetzt, während die Mutterlauge dunkel gefärbt war. Nun wurde der Rest der eingedampften Lösung gleichfalls mit n/1 NaOH versetzt und zur Beschleunigung der Kristallisation Impfkristalle hinzugefügt. Infolge der durch die Impfung beschleunigten Kristallisation waren die sich abscheidenden Kristalle fast völlig farblos. Die Ausbeute betrug 80% der Theorie. Smp. 185°.

Die Aminoverbindung wurde zur Reinigung mit der 30fachen Menge 10%igen Alkohols unter Zusatz von Tierkohle gekocht. Sie kristallisierte beim Erkalten aus der filtrierten Lösung in schönen, farblosen, verfilzten kristallinen Nadeln aus. Smp. 190°.

Analyse:

4,319 mg Subst.	10,16 mg CO_2	1,9 mg H_2O	
2,935 mg „	0,230 ccm N_2 22° 748 mm		
$C_{16}H_{16}O_4N_2$	Ber: 64,00% C	5,33% H	9,01% N
	Gef: 64,25% C	5,00% H	9,32% N.

Das Amino-Benzoyltyrosin ist sehr leicht in Alkohol und Eisessig, in Wasser in der 40fachen Menge löslich und unlöslich in Aceton und Äther. Die neue Verbindung dokumentiert sich als Aminophenol dadurch, daß sie sich an der Luft allmählich grau verfärbt.

a) Benzoyl-Amino-Di-Benzoyl-Tyrosin.

1 g der reinen Aminoverbindung wurde in 10 ccm Alkohol gelöst, 4 ccm n/1 NaOH (2 Mol. = 3,3 ccm) hinzugegeben und mit 1 g Benzoylchlorid (etwas mehr als 2 Mol.) versetzt und heftig unter Kühlung geschüttelt. Die schwach rot gefärbte alkalische Lösung wurde fast farblos, wobei sich ein gelblich weißes schmieriges Produkt abschied, das bald kristallin erstarrte. Die abgesaugten Kristalle schmolzen bei 115°, nachdem sie mit Äther gewaschen wurden, bei 208°. Die ausgefallene Verbindung war also ein Gemisch von Benzoesäure und einem höher schmelzenden Produkt. Die Kristalle waren leicht aus der heißen 30fachen Menge Alkohols umzukristallisieren. Die

nadelförmig zu Büscheln vereinigten Kristalle schmolzen nach mehrmaliger Reinigung konstant bei 225°. Die Ausbeute betrug 90%.

Analyse:

4,810 mg Subst.	12,455 mg CO_2	2,12 mg H_2O
$C_{30}H_{24}N_2O_6$	Ber: 71,0% C	4,92% H
	Gef: 70,65% C	4,93% H

Wie die Amino-Verbindung zeigte auch das benzoylierte Produkt keine Millon'sche Reaktion. Es färbte sich bei der Einwirkung von HNO_2 erst nach einigen Tagen braun, was wohl, da die Kupplungsreaktion negativ verlief, auf eine Nitrierung zurückzuführen ist.

VI. Diazotierung des Amino-Benzoyl-Tyrosins.

Die Diazotierung führte — wie der erste Versuch zeigt — nicht zum Ziel, als sie in verdünnter Lösung vorgenommen wurde. Erst aus konzentrieter salzsaurer Lösung gelang es, die Diazoniumverbindung zu isolieren.

Versuch 1). 1 g der Aminoverbindung wurde in 10 ccm Wasser suspendiert, mit 13 ccm n/1 HCl (4 Mol.) gelöst und 0,4 g $NaNO_2$ (2 Mol.) hinzugefügt. Die Lösung färbte sich gelb und trübte sich etwas. Nach 12 Stunden in Eis hatte sich nichts abgeschieden, die gelbe Lösung war noch trübe.

Da bekanntlich sich die Diazoniumperchlorate durch ihre Unlöslichkeit in Wasser auszeichnen, sollte versucht werden, das Diazoniumperchlorat des Benzoyltyrosins abzuscheiden. Bei Zusatz der berechneten Menge $HClO_4$ zu der gelben Diazoniumlösung schieden sich wohl an den Wänden des Reagenzglases ölige Tropfen ab, die jedoch keine Neigung zur Kristallisation zeigten.

Versuch 2). 2 g der Aminoverbindung wurden in 13 ccm n/1 HCl gelöst und 0,7 g $NaNO_2$ (1,5 Mol.) in einigen Trofen Wasser gelöst hinzugefügt. Es fiel sofort ein bräunlich gelb gefärbtes plastisches Produkt, das nach 2 Stunden kristallin erstarrte. Nach längerem Verweilen in Eis, wurden die gelben Kristalle abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die aus schönen langen Nadeln bestehenden Kristalle ließen sich gut aus der 10fachen Menge siedenden absoluten Alkohols umkristallisieren. Hierbei war schnelles Arbeiten notwendig, da die heiße alkoholische Lösung die Zersetzung der lichtempfindlichen Diazoniumverbindung förderte. Der umkristallisierte Körper besteht aus goldgelben Nadeln, die — dem Licht ausgesetzt — sich bräunen.

Analyse:

3,236 mg Subst.	0,334 ccm N_2 20,5° 759 mm
$C_{15}H_{14}O_4N_3Cl$	Ber: 12,12% N
	Gef: 11,99% N.

Das Diazoniumchlorid ist in der Hitze in Alkohol in der 10fachen Menge, in Aceton in der 100fachen Menge, in Eisessig in gleicher Menge in der Kälte löslich, schwer löslich in Wasser, Chloroform und Äther. Ein mit alkoholischer Lösung des Diazoniumchlorids getränktes Filtrierpapier wurde teilweise mit schwarzem Papier bedeckt und unter die Quecksilber-Quarzlampe gelegt. Nach ca. 2 Stunden wurde das Papier durch ein Kupplungsbad von α-Naphtylaminchlorhydrat gezogen. Die belichteten Stellen kuppelten nicht mehr, dagegen färbten sich die unbelichteten violett. Die belichteten Stellen färbten sich beim Versetzen mit NaOH rotbraun.

Beim Kochen der wässrigen Lösung des Diazoniumchlorids schieden sich allmählich dunkelgefärbte harzige Massen ab, die nach kurzer Zeit erstarrten, jedoch nicht kristallisierten. Sie lösten sich mit schöner roter Farbe in NaOH.

Versuch 3). Zur Isolierung des Diazoniumnitrats wurde ähnlich wie oben verfahren. 2 g der Aminoverbindung wurden in 13,2 ccm n/1 HNO_3 gelöst und mit 0,7 g $NaNO_2$ versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in Eis gestellt, färbte sich sofort gelb, und nach ca. 1 Stunde schieden sich gelbe

Kristalle ab. Das Diazoniumnitrat, um das es sich bei dem auskristallisierten Körper handelte, ließ sich wie das Diazoniumchlorid aus der 10fachen Menge Alkohol umkristallisieren. Es löste sich in der Kälte in der 25fachen Menge Alkohol. In Wasser ist das Diazoniumnitrat in der Hitze in der 30fachen Menge löslich, in der 150fachen Menge kalten Wassers war es noch nicht vollständig gelöst.

VII. Kupplung des Benzoyl-Tyrosin-Diazoniumchlorids mit β-Naphtol.

Zur Kupplung wurden 2 g des Diazoniumchlorids in Wasser gelöst und die klare Lösung in die alkalische Lösung von 0,8 g β-Naphtol in 6 ccm n/1 NaOH unter Schütteln eingetragen. Die Lösung färbte sich langsam rot. Nach 8 Stunden wurde die blau-rot-gefärbte Lösung mit verdünnter Essigsäure angesäuert, und ein leuchtender, hellroter kristalliner Farbstoff gefällt. Der Niederschlag bestand aus kleinen, zu filzigen Aggregaten vereinigten Nadeln. Der rote Farbstoff war sehr leicht in Aceton und Eisessig löslich, ziemlich schwer in Alkohol und Äther und fast unlöslich in Petroläther. Beim Kochen des Farbstoffes mit einem Lösungsmittel trat Zersetzung ein. Beim Fällen des Farbstoffes aus der alkoholischen Lösung mit Wasser war eine starke Gasentwicklung zu beobachten. Wegen dieser Eigenschaften verzichtete ich darauf, ihn umzukristallisieren. Zur Analyse wurde der Farbstoff gut mit Alkohol und eiskaltem Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Analyse:

5,456 mg Subst.	13,280 mg CO_2		2,42 mg H_2O	
3,446 mg „	0,242 ccm N_2	22°	766 mm	
$C_{26}H_{22}O_5N_3$	Ber: 68,20% C		5,02% H	9,23% N
	Gef: 67,96% C		4,82% H	9,60% N.

VIII. Kupplung des Benzoyl-Tyrosin-Diazoniumchlorids mit α-Naphtylamin.

Die Kupplung mit α-Naphtylamin wurde in salzsaurer alkoholischer Lösung vorgenommen. 2 g der Diazoniumverbindung wurden in Alkohol gelöst und in die mit 10 ccm n/1 HCl (1 Mol.) versetzte alkoholische Lösung von 0,3 g α-Naphtylamin eingetragen. Die Lösung färbte sich allmählich violett und nach einigen Stunden schied sich ein violetter, kristalliner Farbstoff ab, der abfiltriert mit konzentrierter Salzsäure gewaschen wurde, wobei sich die Farbe vertiefte.

Der violette Farbstoff war in Alkohol, Eisessig, Essigester und Aceton leicht löslich, schwerer in Äther und fast unlöslich in Petroläther und Wasser. Zur Analyse wurde der Farbstoff in Alkohol gelöst und mit Wasser gefällt. Hierbei fand anscheinend Hydrolyse statt, denn — wie die Analyse zeigt — stimmt der gefundene Chlorwert und Kohlenstoffwert nicht mit dem berechneten überein.

Analyse:

4,641 mg Subst.	12,700 mg CO_2		2,44 mg H_2O		
3,129 mg „	0,144 mg Cl				
2,990 mg „	0,296 ccm N_2	21°	765 mm		
$C_{28}H_{24}N_4O_4Cl$	Ber: 63,53% C		4,88% H	11,40% N	7,23% Cl
	Gef: 74,84% C		5,33% H	11,57% N	4,60% Cl

IX. Diazotierung des Benzoyl-Tyrosins und Kupplung der erhaltenen Diazoniumlösung mit β-Naphtol bzw. α-Naphtylamin.

Wie zu erwarten war, stellten sich der direkten Diazotierung des Benzoyltyrosins große Schwierigkeiten entgegen. Da infolge der geringen Wasserlöslichkeit des Benzoyltyrosins stets große Wassermengen nötig waren, und ich daher gezwungen war, die HNO_2 auf suspendiertes Benzoyltyrosin einwirken zu lassen, gelang es nie, aus der fraglos vorhandenen wässrigen Diazoniumlösung die Diazoniumverbindung abzuscheiden, auch nicht bei Impfung der Lösung mit über die Aminoverbindung hergestelltem Diazoniumnitrat. Nach zahlreichen Versuchen begnügte ich mich mit der Herstellung der Diazoniumlösung. Daß diese die gesuchte Diazoniumverbindung enthielt, wurde durch die Isolierung des Azofarbstoffes bewiesen.

Versuch 1.) 0,4 g Benzoyltyrosin wurden in 40 ccm Wasser suspendiert und mit 0,48 g $NaNO_2$ in wenig Wasser gelöst versetzt und dann unter Schütteln 1 ccm HCl (1,124) hinzugefügt (5 Mol. HNO_2). Nach 15 Stunden war die in Eis gestellte Lösung kanariengelb gefärbt, während am Boden sich anscheinend nicht umgesetztes Benzoyltyrosin abgesetzt hatte. Die überschüssige HNO_2 wurde durch Harnstoffzusatz zerstört und die gelb gefärbte Lösung vom Bodenkörper filtriert. Beim Eindampfen der gelben Lösung im Vakuum, im CO_2-Strom resultierte ein rotes, pulveriges Zersetzungsprodukt.

Versuch 2). Auch beim Arbeiten unter Anwendung geringerer Mengen Wassers konnte die Diazoniumverbindung nicht gewonnen werden.

0,4 g Benzoyltyrosin wurden in 5 ccm Wasser suspendiert, 0,48 g $NaNO_2$ und 1,04 ccm HCl (1,124) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde in einer Glasstopfenflasche im Dunkeln in Eis gestellt und häufig geschüttelt. Die Suspension war nach 18 Stunden gelb gefärbt. Der ursprünglich farblose, jetzt gelbe Bodenkörper löste sich nach 40 Stunden größtenteils in Wasser. Nach weiteren 18 Stunden war ein großer Teil der gelösten Substanz wieder ausgefallen. Nach 8tägigem Verweilen des Gemisches in Eis hatte sich ein aus gelben Kristallen bestehender Bodenkörper abgeschieden. Die überstehende gelbe wässrige Lösung zeigte Kupplungsreaktion. Eine kleine Menge der abgeschiedenen Kristalle wurde mit etwas Wasser versetzt, wobei ein Teil in Lösung ging. Der Rückstand wurde abgesaugt und im Vakuumexsikkator getrocknet. Er zeigte Millon'sche Reaktion und schmolz bei 140° unter Gasentwicklung.

Die Vermutung lag nahe, daß die gelb gefärbte Substanz vielleicht z. T. aus Nitro-Benzoyltyrosin bestand. Um festzustellen, ob in einer derart verdünnten Lösung eine Nitrierung durch die in geringen Mengen entstandene Salpetersäure erfolgen kann, wurde 0,05 g Benzoyltyrosin mit 1,5 ccm n/1 HNO_3 versetzt, was einer Salpetersäure von ca. 0,03% — wie sie vermutlich in obigem Reaktionsgemisch vorlag — entspricht. Es trat nach einiger Zeit eine intensiver werdende Gelbfärbung auf. Somit ist es wahrscheinlich, daß auch in der bei der Diazotierung vorliegenden Verdünnung eine Nitrierung erfolgt. Eine Trennung des Benzoyltyrosins von dem mit HNO_2 umgesetzten Produkt war leider nicht möglich.

Versuch 3). Es ist bekannt, daß die Diazoniumperbromide in Wasser unlöslich sind. Ich versuchte deshalb, aus der wässrigen Diazoniumlösung das Diazoniumperbromid des Benzoyltyrosins abzuscheiden. Die aus 0,2 g Benzoyltyrosin, 2 ccm Wasser, 0,24 g $NaNO_2$ und 0,5 ccm HCl (1,124) bereitete Diazoniumlösung wurde mit einer Lösung von 0,04 ccm Brom in 0,16 g KBr. in wenig Wasser (etwas mehr als 1 Mol.) versetzt. Es fiel sofort ein gelbes öliges Produkt, das nach kurzer Zeit kristallin erstarrte. Die abgesaugten Kristalle waren in heißem Alkohol löslich, schwer in Wasser und Äther und schmolzen bei 225° unter Zersetzung.

Da die Möglichkeit für eine Bromierung des Phenolkerns bestand, wurde in Wasser gelöstes Benzoyltyrosin mit derselben Lösung versetzt, wobei sich ebenfalls ein kristalliner Körper abschied, der abgesaugt aus Alkohol um-

kristallisiert wurde. Er schmolz bei 245° unter Zersetzung und erwies sich nach der Analyse als die Di-Bromverbindung des Benzoyltyrosins, wie bereits oben beschrieben wurde.

Das aus der Diazoniumlösung mit KBr_3 gefällte Produkt erwies sich als ein untrennbares Gemisch, sodaß die Isolierung auf diesem Wege auch nicht gelang.

Versuch 4). Die unter denselben Bedingungen wie oben hergestellte Diazoniumlösung wurde nun zur Gewinnung des Diazoniumperchlorats mit der berechneten Menge 70%iger $HClO_4$ versetzt. Aus dem Gemisch hatten sich nach 24stündigem Verweilen in Eis an den Wänden des Reagenzglases ölige Tropfen abgeschieden, die auch noch nach Tagen keine Neigung zu kristallisieren zeigten. Da auch aus der durch Diazotierung des Amino-Benzoyltyrosins gewonnenen Diazoniumlösung das Diazoniumperchlorat nicht abgeschieden werden konnte, war das negative Ergebnis dieses Versuches nicht überraschend.

1. Kupplung mit β-Naphtol.

Da eine Isolierung der festen Diazoniumverbindung durch die Diazotierung des Benzoyltyrosins nicht gelang, begnügte ich mich mit der Isolierung des Kupplungsproduktes. Die Diazoniumlösung wurde nochmals nach der auf Seite 62 beschriebenen Methode hergestellt. Nach 24 Stunden in Eis wurde dann die aus 0,6 g Benzoyltyrosin, 120 ccm Wasser (die Menge des umgesetzten Benzoyltyrosins war bei Anwesenheit von viel Wasser größer), 0,72 g $NaNO_2$ und 10,8 ccm n/1 HCl bereitete und von 0,2 g nicht umgesetzter Substanz filtrierte Diazoniumlösung in die alkalische Lösung von 0,2 g β-Naphtol in 15 ccm n/1 NaOH gelöst eingetragen. Es wurde etwas weniger als die berechnete Menge β-Naphtol (statt 0,284 g 0,20 β-Naphtol) angewendet, da die Reaktion nicht als quantitativ angesehen werden kann. Die Kupplung geht bedeutend langsamer vor sich als die der isolierten Diazoniumverbindung, auch ist die Farbe der Kupplungslösung nicht so intensiv wie die aus der Diazoniumverbindung und β-Naphtol hergestellten Kupplungslösung. Nach 30stündiger Kupplung, wobei die entstandene Rotfärbung sich mehr und mehr vertiefte, wurde mit verdünnter Essigsäure angesäuert. Es fiel ein aus winzigen, kristallinen Nadeln bestehender roter Farbstoff aus. Nach 6stündigem Stehen war die überstehende Lösung fast farblos. Der rote abgeschiedene Farbstoff wurde abgesaugt. Ausbeute: 0,54 g ca. 90% der Theorie.

Zur Reinigung anhaftender β-Naphtolreste wurde der Farbstoff einige Stunden mit Alkohol verrührt stehengelassen und abfiltriert. Da beim Erhitzen mit einem Lösungsmittel der Farbstoff sich ebenfalls wie der aus dem Diazoniumchlorid durch Kupplung mit β-Naphtol gewonnene zersetzte, wurde der nicht umkristallisierte Farbstoff analysiert.

Analyse:

4,453 mg Subst.	11,42 mg CO_2	1,9 mg H_2O	
2,970 mg „	0,215 ccm N 21° 752 mm		
$C_{26}H_{22}O_5N_3$	Ber: 68,20% C	4,82% H	9,2% N
	Gef: 67,80% C	4,82% H	8,82% N.

Der erhaltene Farbstoff erwies sich nach der Analyse somit identisch mit dem Kupplungsprodukt aus Benzoyltyrosin-Diazoniumchlorid mit β-Naphtol. Auch die Eigenschaften sind dieselben. Er ist leicht löslich in Aceton, Eisessig und Methylalkohol, ziemlich schwer in Äthyl-Alkohol und Äther und unlöslich in Wasser, Ligroin und Petroläther.

2. Kupplung mit α-Naphtylamin.

Zur Gewinnung des α-Naphtylaminfarbstoffes wurde die Diazoniumlösung in die mit einem Mol. n/1 HCl versetzte alkoholische Lösung berechneter Mengen α-Naphtylamin eingetragen. Die verhältnismäßig langsam vor sich gehende Kupplung färbte die Lösung allmählich violett. Nach 8 Stunden

hatte sich ein violetter Farbstoff abgeschieden, während die überstehende Lösung fast farblos war. Er wurde abgesaugt und im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Der Farbstoff besitzt dieselben Eigenschaften wie der durch Kupplung des Diazoniumchlorids mit α-Naphtylamin gewonnene, ist also leicht löslich in Aceton, Alkohol, Eisessig und Essigester, schwerer in Äther und unlöslich in Petroläther und Wasser. Die Analyse des aus alkoholischer Lösung mit Wasser gefällten Farbstoffes lieferte merkwürdigerweise einen Kohlenstoffwert, der nicht auf die zu erwartende Formel stimmte, während Wasserstoff- und Stickstoffwert mit dem berechneten gut übereinstimmte.

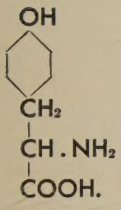
Analyse:

5,03 mg Subst.	13,025 mg CO_2	2,31 mg H_2O	
2,895 mg „	0,287 ccm N_2 22° 743 mm		
$C_{26}H_{24}O_4N_4Cl$	Ber: 63,53% C	4,88% H	11,40% N
	Gef: 70,66% C	4,96% H	11,22% N.

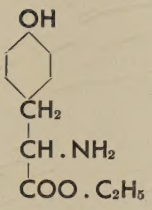
Die Darstellung der beschriebenen Mono-N-Benzoyl-Tyrosin-Azofarbstoffe nach den geschilderten Methoden, ihre Übereinstimmung bezüglich der analytischen Zusammensetzung und ihre Eigenschaften und die Analogie zwischen den mit salpetriger Säure behandelten Tyrosinderivaten und den mit salpetriger Säure behandelten Proteinen können zweifellos als ein Beweis für die aufgestellte Theorie der Entstehung von Diazoniumkörpern des Tyrosins bei Einwirkung der salpetrigen Säure auf Wolle oder Seide betrachtet werden.

Meine Beweisführung gründet sich auf die im Folgenden schematisch dargestellten Produkte und Reaktionswege:

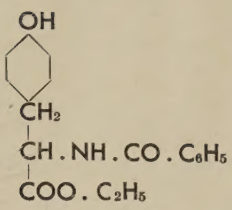
Siehe nächste Seite.



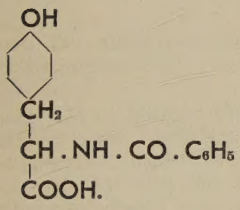
l-Tyrosin.



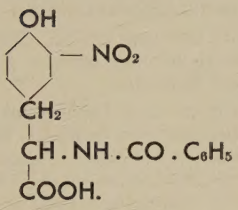
Tyrosinäthylester.



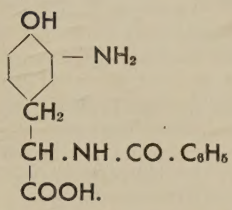
Benzoyltyrosinäthylester.



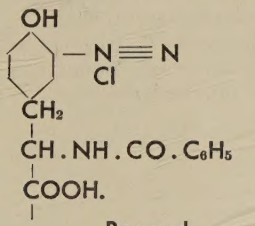
Benzoyltyrosin.



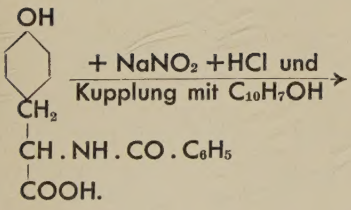
Nitro-Benzoyltyrosin.



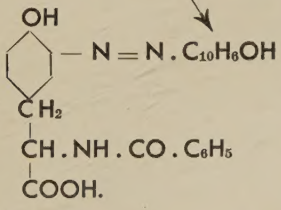
Amino-Benzoyltyrosin.



Benzoyl-
Tyrosindiazoniumchlorid.



Benzoyltyrosin.



Benzoyltyrosin-Azo-Naphtol.

Lebenslauf.

Ich bin am 28. Oktober 1906 in Jassy (Rumänien) geboren und Sohn des Oberbergrats a. D. Rohrlich, Berlin-Charlottenburg.

Nach Abschluß des Real-Gymnasiums in Oschersleben/Bode mit dem Abitur im April 1925 praktizierte ich ein halbes Jahr im Eisenhüttenwerk in Thale a. Harz in verschiedenen Betrieben.

Im Herbst 1925 begann ich an der Technischen Hochschule in München zu studieren. Ich hörte Vorlesungen von Prof. Dr. Hans Fischer und arbeitete im Laboratorium des Herrn Prof. Dr. Manchot. Nach 2 Semestern übersiedelte ich an die Universität Berlin, setzte meine in München begonnenen anorganischen Arbeiten im physikalisch-chemischen Institut fort und absolvierte mein erstes Verbandsexamen bei Herrn Geheimrat Dr. Marckwald am 25. Januar 1929. Meine organisch-präparative Ausbildung erhielt ich im Laboratorium des Herrn Prof. Dr. Rosenheim, Berlin, bei dem ich im November 1929 mein zweites Verbandsexamen ablegte.

Meine im Sommer 1931 beendete Doktorarbeit machte ich im Technisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerngroß und promovierte zum Dr. phil. im Dezember 1932 an der Universität Berlin.